

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
ACTIVIDAD ALEXÍTERA DE *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm Y *Mucuna cf. elliptica* SOBRE VENENO DE *Bothrops atrox* (PITALALA).**

**AUTORA:
KARINA JENNIFER GAMBOA CÓRDOVA**

**TUTOR:
MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS**

Quito, octubre del 2018

Cesión de derechos de autor

Yo Karina Jennifer Gamboa Córdova con documento de identificación N° 172084640-9, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “ACTIVIDAD ALEXÍTERA DE *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm Y *Mucuna cf. elliptica* SOBRE VENENO DE *Bothrops atrox* (PITALALA)”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Karina Jennifer Gamboa Córdova

Cédula: 172084640-9

Fecha: Octubre del 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo Marco Fernando Cerna Cevallos, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, ACTIVIDAD ALEXÍTERA DE *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm Y *Mucuna cf. elliptica* SOBRE VENENO DE *Bothrops atrox* (PITALALA), realizado por Karina Jennifer Gamboa Córdova, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerado como trabajo final de titulación.

Quito, octubre del 2018

Marco Fernando Cerna Cevallos
Cédula: 0501872071

Agradecimientos

Quiero agradecer principalmente a mis padres y a mi hermano quienes han sido el soporte para darme apoyo en todo momento y han estado junto a mí a lo largo de toda esta trayectoria, me han dado sus palabras de aliento para poder seguir adelante y es por ese motivo que les agradezco por haberme guiado a alcanzar esta meta.

Al laboratorio de Ciencias de la Vida ya que me brindaron su apoyo para poder realizar dicha investigación.

Al Q.F. Wilson Tapia y MSc. Michael Venegas por haberme guiado y asesorado en el desarrollo de este proyecto.

A todos aquellos que estuvieron junto a mí les doy mil gracias pues han ido apoyándome durante todo este proyecto de investigación.

Índice

Introducción	1
Capítulo I: Marco Conceptual.....	3
1.1 Serpientes	3
1.1.1 Características generales.....	3
1.2 Serpientes en Ecuador	4
1.3 Género Bothrops	4
1.3.1 <i>Bothrops atrox</i>	6
1.3.1.1 Generalidades	6
1.3.1.2 Distribución y Hábitat	6
1.3.2 Veneno de <i>Bothrops atrox</i>	7
1.3.3 Efectos del veneno de <i>Bothrops atrox</i>	10
1.3.3.1 Acción proteolítica	10
1.3.3.2 Acción coagulante	12
1.3.3.3 Acción hemolítica	13
1.3.4 Accidente Bothrópico	14
1.3.5 Tratamiento para la mordedura de ofidios Bothróticos.....	15
1.4 Plantas Alexíteras	16
1.4.1 Características de las plantas alexíteras	17
1.4.1.1 Componentes activos.....	18
1.4.1.1.1 Fenoles	18

1.4.1.1.2	Curcuminoides	20
1.4.1.1.3	Flavonoides	21
1.4.1.1.4	Alcaloides	22
1.4.1.1.5	Triterpenos	23
1.4.1.1.6	Taninos.....	23
1.4.2	Actividad Alexítera	25
1.5	Especies estudiadas	25
1.5.1	<i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm (Barbasco)	25
1.5.1.1	Descripción.....	25
1.5.1.2	Clasificación taxonómica	26
1.5.1.3	Usos	27
1.5.2	<i>Mucuna cf. elliptica</i>	28
1.5.2.1	Descripción.....	28
1.5.2.2	Clasificación taxonómica	28
1.5.2.3	Usos	29
Capítulo II: Materiales y métodos.....		30
2.1	Diseño.....	30
2.2	Material vegetal.....	30
2.3	Veneno	31
2.4	Preparación de extractos.....	31
2.4.1	Extracto alcohólico	32
2.4.2	Extracto heptánico.....	32

2.5	Determinación de fenoles	32
2.5.1	Curva de calibración de fenoles totales.....	33
2.5.2	Cuantificación de Fenoles totales	34
2.6	Determinación de flavonoides	35
2.6.1	Curva de calibración para quercetina.....	35
2.6.2	Cuantificación de flavonoides.....	36
2.7	Actividad coagulante.....	37
2.7.1	Dosis mínima de coagulación (DMC)	37
2.7.2	Prueba de anti coagulación	38
2.8	Determinación de la Actividad anti hemolítica	39
2.8.1	Obtención de glóbulos rojos (eritrocitos).....	39
2.8.2	Método hemolítico por espectrofotometría.....	39
2.9	Determinación de actividad anti proteolítica.....	40
2.10	Determinación del perfil proteico (SDS PAGE)	41
2.10.1	Preparación de reactivos	41
2.10.2	Preparación de muestras.....	45
2.10.3	Preparación de geles.....	46
2.10.4	Preparación del sistema de ensamblaje y corrida.....	47
Capitulo III: Resultados y Discusión		49
3.1	Rendimiento de los extractos de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm y <i>Mucuna cf. elliptica</i>	49
3.2	Análisis de fenoles totales	51

3.3	Análisis de flavonoides totales	54
3.4	Actividad anticoagulante	56
3.4.1	Análisis estadístico de la actividad anticoagulante	59
3.5	Actividad anti hemolítica	64
3.6	Actividad anti proteolítica	67
3.6.1	Análisis estadístico de la actividad anti proteolítica	69
3.7	Perfil proteico en electroforesis SDS-page	70
3.7.1	Determinación del peso molecular de las bandas	72
Conclusiones		82
Referencias.....		85
Anexos		104

Índice de tablas

Tabla 1. Factores de coagulación.....	10
Tabla 2. Cuadro clínico del accidente Bothrópico.....	15
Tabla 3. Accidente Bothrópico según la gravedad	15
Tabla 4. Identificación taxonómica del barbasco	26
Tabla 5. Identificación taxonómica del wapaá.....	29
Tabla 6. Partes de la planta que se usaron para elaborar los extractos secos.....	31
Tabla 7. Datos para la curva de calibración de ácido gálico.....	34
Tabla 8. Datos para la curva de calibración de quercetina.....	36
Tabla 9. Solución tampón TRIS-HCl 1.5 M.....	41
Tabla 10. Solución tampón TRIS-HCl 0.5 M.....	41
Tabla 11. Solución SDS 10 %.....	42
Tabla 12. Persulfato de amonio APS 10 %	42
Tabla 13. Poliacrilamida 30%	42
Tabla 14. Composición de los geles	43
Tabla 15. Tampón de electroforesis 10 X Tris Glicina.....	43
Tabla 16. Tampón de muestra.....	44
Tabla 17. Tampón de electroforesis 1X Tris Glicina.....	44
Tabla 18. Solución decolorante de los geles	44
Tabla 19. Solución de azul de Commassie	45
Tabla 20. Densidades relativas y la cantidad en microlitros de los extractos de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm (Barbasco) y <i>Mucuna cf. elliptica</i> (Wapaá)	46
Tabla 21. Porcentaje de rendimiento de los extractos de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm y <i>Mucuna cf. elliptica</i>	49

Tabla 22. Datos de la concentración en ppm de fenoles en extractos alcohólicos de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm (Barbasco) y <i>Mucuna cf. elliptica</i> (Wapaá)	52
Tabla 23. Datos de la concentración en ppm de flavonoides en extractos alcohólicos de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm (Barbasco) y <i>Mucuna cf. elliptica</i> (Wapaá).....	54
Tabla 24. Tiempos de coagulación del plasma humano	57
Tabla 25. Tiempo de coagulación de los extractos alcohólicos y heptánicos de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm (Barbasco) y <i>Mucuna cf. elliptica</i> (Wapaá) en plasma sanguíneo con veneno de <i>B. atrox</i>	58
Tabla 26. ANOVA de los tiempos de coagulación.....	59
Tabla 27. Análisis post hoc (Tukey) para especie vegetal de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm (Barbasco) y <i>Mucuna cf. elliptica</i> (Wapaá).....	60
Tabla 28. Análisis post hoc (Tukey) para tipo de extracto en <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm y <i>Mucuna cf. elliptica</i>	62
Tabla 29. Análisis post hoc (Tukey) para interacción especie con extracto de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm y <i>Mucuna cf. elliptica</i>	63
Tabla 30. Actividad anti hemolítica de los extractos de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm y <i>Mucuna cf. elliptica</i>	65
Tabla 31. Actividad proteolítica expresada en Unidades/mg de los extractos heptánicos y alcohólicos de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm y <i>Mucuna cf. elliptica</i>	67
Tabla 32. ANOVA de la actividad anti proteolítica para los extractos heptánicos y alcohólicos de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm y <i>Mucuna cf. elliptica</i>	70
Tabla 33. Peso molecular de la proteína patrón y su recorrido por el gel de electroforesis	73
Tabla 34. Número de bandas de cada una de las muestras depositadas en el gel de electroforesis	74

Tabla 35. Peso molecular de las proteínas del veneno de <i>B. atrox</i> en kDa.....	75
Tabla 36. Peso molecular de las proteínas del extracto heptánico y alcohólico de hojas de <i>Lonchocarpus utilis</i>	76
Tabla 37. Peso molecular de las proteínas del extracto heptánico y alcohólico de hojas de <i>Mucuna elliptica</i>	78
Tabla 38. Peso molecular de las proteínas del extracto heptánico y alcohólico de la raíz de <i>Lonchocarpus utilis</i>	80

Índice de figuras

Figura 1. Víbora <i>B. atrox</i> llamada comúnmente pitalala o equis.....	7
Figura 2. Esquema de la cascada clásica de coagulación. Se basa principalmente en dos vías la intrínseca y extrínseca que en conjunto con los factores de coagulación van a polimerizar la fibrina dando como resultado la formación de un coágulo.....	9
Figura 3. Estructura química del ácido gentísico	19
Figura 4. Estructura química del ácido cafeico.....	20
Figura 5. Estructura química de la cumarina	20
Figura 6. Estructura química general de los flavonoides	22
Figura 7. Ácidos aristolóquicos presente en <i>Aristolochia</i>	22
Figura 8. Triterpenoides más importantes: ácido ursólico, el ácido oleanólico y el lupeol.....	23
Figura 9. Estructura química del ácido tánico.....	24
Figura 10. Perfil electroforético de las bandas de las especies vegetales de <i>L. utilis</i> y <i>M. elliptica</i> frente a una proteína y veneno patrón.	72
Figura 12: curva de calibración de flavonoides totales.....	107
Figura 13: curva de calibración de fenoles totales.....	109

Índice de anexos

Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm (Barbasco)	104
Anexo 2. Certificado de identificación taxonómica de <i>Mucuna cf. elliptica</i> (Wapaá)	105
Anexo 3. Porcentaje de rendimiento para extractos alcohólicos	106
Anexo 4. Porcentaje de rendimiento para extractos heptánicos.....	106
Anexo 5. Datos para la curva de calibración de ácido gálico	107
Anexo 6. Curva de calibración de fenoles que representa ppm de ácido gálico.....	107
Anexo 7. Absorbancias y contenido de flavonoides en ppm de los extractos alcohólicos de <i>Mucuna cf. elliptica</i> y <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm	108
Anexo 8. Datos para la curva de calibración de quercetina	109
Anexo 9. Curva de calibración de flavonoides que representa ppm de ácido gálico vs absorbancias.....	109
Anexo 10. Absorbancias y contenido de flavonoides en ppm de los extractos alcohólicos de <i>Mucuna cf. elliptica</i> y <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm.....	110
Anexo 11. Actividad coagulante del veneno de <i>Bothrops atrox</i> sobre plasma sanguíneo	111
Anexo 12. Actividad coagulante del veneno de <i>Bothrops atrox</i> con adición de los extractos de <i>Mucuna cf. elliptica</i> sobre plasma sanguíneo.	111
Anexo 13. Actividad coagulante del veneno de <i>Bothrops atrox</i> con adición de los extractos de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm sobre plasma sanguíneo.	112
Anexo 14: Absorbancias de la prueba de hemólisis del veneno de <i>Bothrops atrox</i> + extractos heptánicos de <i>Mucuna cf. elliptica</i> y <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm	113

Anexo 15. Absorbancias de la prueba de hemólisis del veneno de <i>Bothrops atrox</i> + extractos alcohólicos de <i>Mucuna cf. elliptica</i> y <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm	113
Anexo 16. Absorbancias de la prueba de proteólisis del veneno de <i>Bothrops atrox</i> + extractos heptánicos <i>Mucuna cf. elliptica</i> y <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm	114
Anexo 17. Absorbancias de la prueba de proteólisis del veneno de <i>Bothrops atrox</i> + extractos alcohólicos <i>Mucuna cf. Elliptica</i> y <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm	114
Anexo 18. Perfil electroforético de <i>Lonchocarpus utilis</i> A.C. Sm y <i>Mucuna cf. Elliptica</i> en gel de poliacrilamida SDS-page	115
Anexo 19. Curva del RF vs el logaritmo del peso molecular de la proteína patrón	116

Resumen

Las mordeduras por víboras venenosas como *Bothrops atrox* son muy frecuentes en Ecuador, especialmente en zonas rurales de la Amazonía en donde las víctimas son tratadas, en primera instancia, con plantas que según los nativos alivian el dolor. En esta investigación se evaluó la capacidad de los extractos de *Lonchocarpus utilis* y *Mucuna elliptica* para inhibir los efectos nocivos del veneno de la serpiente pitalala sobre la sangre humana.

Las muestras vegetales se recolectaron en los cantones Morona y Huamboya en la provincia Morona Santiago; a partir de estas, se obtuvo extractos alcohólicos y heptánicos con los que se ensayaron pruebas *in vitro* de anticoagulación, antiproteólisis, antihemólisis. Además mediante electroforesis vertical con gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se observó el cambio en el perfil proteico del veneno al ser tratado con los extractos vegetales. También se determinó las concentraciones de fenoles y flavonoides mediante espectrofotometría UV-VIS. Los resultados demostraron que el extracto alcohólico de *L. utilis* fue el más eficaz en aumentar el tiempo de coagulación del plasma (>60 segundos) y presentó mayor capacidad antiproteolítica; en cuanto al efecto anti hemolítico solo el extracto alcohólico de hojas de *L. utilis* presentó dicha capacidad ya que la hemoglobina liberada fue de solo 19.60 %. En el perfil proteico aparecieron mayor cantidad de bandas en el extracto de raíz de *L. utilis* lo que indica que el efecto del veneno es mitigado por causa de los componentes de los extractos vegetales.

Palabras claves: *Bothrops atrox*, *Lonchocarpus utilis*, *Mucuna elliptica*, alexítera.

Abstract

Bites by poisonous snakes as *Bothrops atrox* are very common in Ecuador, especially in rural areas of the Amazon where the victims are treated, in the first instance, with plants that relieve pain according to the natives. This research evaluated the ability of extracts of *Lonchocarpus utilis* and *Mucuna elliptica* to inhibit the harmful effects of the venom of the snake pitalala on human blood.

Plant samples were collected in the cantons Morona and Huamboya in Morona Santiago province; from these, alcoholic extracts and heptanics that assayed in vitro testing of anticoagulation, antiproteolytic, antihemolytic were obtained. Furthermore by vertical electrophoresis in denaturing conditions (SDS-PAGE) polyacrylamide gel was observed change in the protein from the venom profile to be treated with vegetable extracts. Also determined the concentrations of phenolics and flavonoids by UV-VIS spectrophotometry. The results showed that the alcoholic extract of *L. utilis* was the most effective in increase the clotting time (> 60 seconds) and introduced greater capacity antiproteolitic; as regards the hemolytic effect only the alcoholic extract of leaves of *L. utilis* presented such capacity since released hemoglobin was only 19.60 %. In the protein profile as many bands appeared in *L. utilis* root extract which indicates that the effect of the poison is mitigated because of the components of the plant extracts.

Keywords: *Bothrops atrox*, *Lonchocarpus utilis*, *Mucuna elliptica*, alexiter.

Introducción

La mordedura por víboras venenosas constituye un problema sanitario mundial ya que se ha estimado que existen 5.5 millones de casos al año, con alrededor de 20 000 a 130 000 muertes (González-Andrade & Chippaux, 2010). En América Latina las cifras afirman que existen aproximadamente 150 000 accidentes anuales con alrededor de 5 000 muertes por mordedura de víboras (Creagh, Pérez, Gámez, & Dueñas, 2017).

Ecuador al ser un país con una gran extensión de selva amazónica posee un clima tropical propicio para el desarrollo de estos ofidios (MSP de Ecuador, 2008). Se han reportado de 1 200 a 1 400 accidentes ofídicos y la mayoría ocurre en la Amazonía siendo las provincias más afectadas Orellana, Morona Santiago, Zamora y Napo (Guamán & Cabrera, 2012). Existen en Ecuador más de 400 especies de serpientes y alrededor de 45 de ellas son venenosas; además existen 5 géneros de serpientes en el oriente que son consideradas importantes: *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Lachesis* y *Micrurus* (Praba-Egge et al., 2003); de estos, el género *Bothrops* provoca más casos de accidentes por mordedura: alrededor del 79 % en Ecuador (Gualán, 2011); siendo *Bothrops atrox* la responsable de un gran número de accidentes alrededor del 70 al 80 % (MSP de Ecuador, 2008). Esto conlleva a un problema de salud pública que es necesario atender, los accidentes se convierten en graves o fatales debido a la falta de tratamiento inmediato, puesto que ocurren en zonas poco accesibles (Avendaño, 2016).

En zonas rurales especialmente en países con insuficiente atención hospitalaria el primer tratamiento para las mordeduras es la medicina tradicional (S. Jiménez, 2012). Se considera que existen alrededor de 800 plantas que contrarrestan los efectos

provocados por mordeduras de víboras; a estas se las denomina alexitéricas o alexíteras de las cuales gran parte de ellas se encuentran en zonas tropicales (J. López & Pérez, 2009). Las especies vegetales de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm (Barbasco) y *Mucuna cf. elliptica* (Wapaá) han sido usadas por los nativos indígenas de Morona Santiago como especies antiofídicas o alexíteras.

Es importante recalcar que no todas las plantas alexíteras son consideradas antídotos, muchas de estas plantas solo amenoran la sintomatología de la mordedura de las serpientes y ayudan a incrementar la permeabilidad capilar para combatir infecciones causadas por la mordedura de ofidios (J. López & Pérez, 2009).

Este estudio tiene como finalidad comprobar en laboratorio la actividad inhibitoria de los extractos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf. elliptica* sobre el veneno de *Bothrops atrox*. De esta manera se busca dar un sustento científico al conocimiento ancestral sobre el uso de estas dos especies vegetales en el tratamiento antiofídico.

Se planteó como objetivo general evaluar la actividad alexítera de los extractos totales de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf. elliptica* sobre los efectos del veneno de *Bothrops atrox* (pitalala) en la sangre humana; y como objetivos específicos determinar la concentración de flavonoides y fenoles totales en los extractos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf. elliptica*, analizar la actividad anticoagulante, anti hemolítica y anti proteolítica de los extractos vegetales sobre los efectos coagulante, hemolítico y proteolítico del veneno de *B. atrox* sobre sangre humana y determinar el perfil proteico del veneno de *Bothrops atrox* (Pitalala) antes y después del tratamiento con extractos totales de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf. elliptica*.

Capítulo I:

Marco Conceptual

1.1 Serpientes

1.1.1 Características generales

Son reptiles de sangre fría (poiquiloterms), es decir, que por sí mismos no pueden regular su temperatura; tienen un cuerpo muy alargado y presentan escamas y mudan o cambian de piel a lo largo de toda su vida, además carecen de párpados móviles, se reproducen por huevos y se alimentan de muchos tipos de alimentos especialmente de roedores, anfibios, mamíferos y otros reptiles (Zelaya & Díaz, 2017); en cuanto al veneno de las serpientes su veneno éste se encuentra constituido por una mezcla de alrededor de 20 polipéptidos distintos, pues su inoculación a las víctimas produce intoxicación y su gravedad dependerá de constituyentes que son propios del veneno (Solís, Nogués, Ruiz, & Cerezo, 2008).

Así mismo las serpientes presentan distintos colores y diseños en sus cuerpos que son características que nos permiten identificar a cada una de las diferentes especies según sus variaciones de color; por otra parte al carecer de extremidades locomotoras se pueden mover de un lado hacia otro mediante distintos movimientos, a este mecanismo se lo denomina reptar (Alperin, Bonino, Bruno, & Reati, 2015).

Por lo general las serpientes comparten ciertas particularidades, pero existen otros caracteres importantes con los que se puede diferenciar a las serpientes no venenosas de las venenosas; así como por ejemplo las serpientes no venenosas son ovíparas con cabeza elíptica, no tienen foseta loreal, son de hábitat acuático, arbóreo y terrenal; mientras que las serpientes venenosas comúnmente llamadas víboras son ovovivíparas

o vivíparas, tienen cabeza en forma de triángulo, poseen foseta loreal y son de hábitat terrenal (Ferrari, Gallo, Ghidini, & Verón, 2011).

1.2 Serpientes en Ecuador

Generalmente la mayoría habita en climas tropicales entre los 1000 a 2000 m.s.n.m de las cuales solo el 17 % son consideradas peligrosas para el ser humano (Betancourt, 2012). En nuestro país existen 3 familias venenosas que son las que provocan accidentes ofídicos como son: Hidropidae, Elapidae y Viperidae. Las serpientes de la familia Hidropidae se caracterizan por ser acuáticas, pequeñas, poseen un veneno neurotóxico que provoca paro respiratorio y los géneros más representativos son *Pelamis* y *Laticuada*; por otro lado las especies de la familia Elapidae son serpientes pequeñas que habitan en lugares húmedos, su veneno posee enzimas como las neurotoxinas y fosfolipasa A2, el género típico de esta familia es *Micrurus* (Zelaya & Díaz, 2017); y las serpientes de la familia Viperidae son las responsables de alrededor del 95 % de accidentes ofídicos además poseen un sistema venenoso muy complejo y se los conoce como destructores de tejidos (Zuñiga-Carrasco & Caro-Lozano, 2013), tienden a dormir en el día mientras que en las noches salen a alimentarse, el género más representativo de esta familia es *Bothrops* (Zelaya & Díaz, 2017).

1.3 Género *Bothrops*

Es un género de serpiente venenosa que agrupa 32 especies distribuidas desde el noreste de México, América Central y la mayor parte en Sudamérica (Melero, Perucho, & Reyes, 2010); en el Ecuador existen 6 especies de las cuales las más conocidas son *Bothrops atrox* en el Oriente y *Bothrops asper* en la Costa ecuatoriana (Betancourt, 2012).

Estas víboras terrestres Son muy agresivas si son molestadas (Romero & Silva, 2013), presentan diversos tamaños que van desde 0.7 a 2.5 metros, habitan en lugares tropicales a una altura aproximada de 1500 m.s.n.m y comúnmente son llamadas “lanzas” debido a la forma de su cabeza (Praba-Egge et al., 2003); son de hábitat nocturno y las hembras son más grandes que el macho (Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación, 2014).

Por otra parte el veneno de este género ocasiona lesiones graves en el organismo de sus víctimas pues su contenido presenta una mezcla de enzimas tales como la fosfolipasa las cuales pueden actuar como neurotoxinas y miotoxonas; las neurotoxinas son las que interfieren en mecanismos de transmisión nerviosa a nivel post y pre sináptico, mientras que las miotoxinas son las responsables de la destrucción de los tejidos (Cartujano, Guadarrama, Mendoza, & Mondragón, 2008) ; otra enzima es la hialuronidasa que provoca daños tisulares a nivel local y además daña el sitio de la mordedura (Delgadillo et al., 2013); y la enzima aminoácido-esterasa que influye en la liberación de bradiquina provocando acciones procoagulantes (J. Jiménez, 2015). El veneno bothrópico una vez inoculado en la víctima comienza a esparcirse por todo el organismo mediante tres mecanismos; primero a través de una célula a otra llegando así a varios tejidos, segundo por medio de la vía linfática y el tercero mediante las articulaciones (Córdova, G, & Santos, 2013). Cabe recalcar que estas víboras solo usan una parte de su veneno cuando muerden a sus víctimas, es decir que solo inyectan una dosis mínima de veneno al momento de ocurrir la mordedura (Ferrari et al., 2011).

1.3.1 *Bothrops atrox*

1.3.1.1 Generalidades

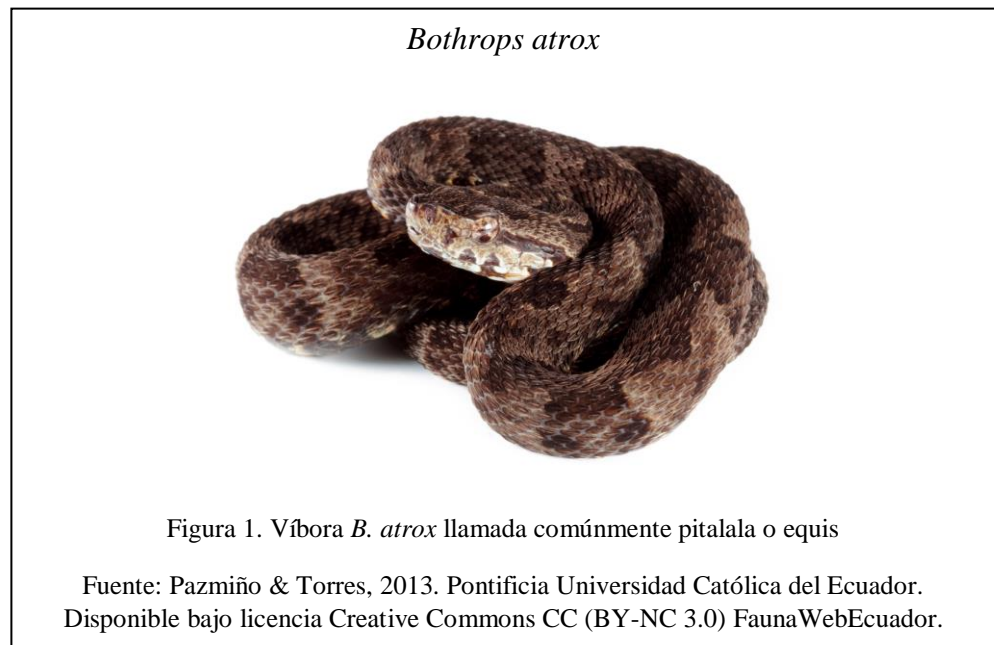
B. atrox es conocida como equis o pitalala, es la causante de la mayoría de incidentes ofídicos con un 70 a 80 % de casos a nivel nacional (MSP de Ecuador, 2008) y según la Lista Roja de los Reptiles del Ecuador el estatus de conservación de esta especie es de preocupación menor (Carrillo, Aldás, & Altamirano, 2005).

Esta especie se diferencia de otras del género *Bothrops* por tener las siguientes características: cola no prensil, suturas supra labiales bordeadas con un color oscuro, hileras de escamas dorso mediales, franja post orbital de color café oscuro, el dorso presenta un pigmento café, oliva y habano (Pazmiño-Otamendi, 2013). Además tiene un cuerpo delgado de forma cilíndrica, pueden alcanzar los 2 metros de longitud (Figura 1), son de hábitos nocturnos y terrestres; y en cuanto a su alimentación los jóvenes suelen comer ranas y culebras mientras que los adultos consumen roedores, aves, serpientes y peces; también estos animales se reproducen aproximadamente 2 veces al año y pueden llegar a tener hasta 30 crías (Foil, 2012).

1.3.1.2 Distribución y Hábitat

Principalmente se distribuyen por el norte y centro de Sudamérica en zonas como el bosque montano oriental, bosque pie montano oriental y bosque húmedo tropical ubicados en pisos tropicales y subtropicales con alturas que van desde 0 a 1200 m.s.n.m. En el Ecuador se ubican en la región amazónica en las provincias de Morona Santiago, Pastaza, Napo, Orellana y Zamora Chinchipe. Por lo general se las encuentra cerca de cuerpos de agua ya que prefieren zonas húmedas y llenas de

vegetación, sin embargo, se han encontrado serpientes jóvenes que habitan en arbustos mientras que los adultos se los encuentra prácticamente en el suelo (Pazmiño & Torres, 2013).



1.3.2 Veneno de *Bothrops atrox*

El veneno de esta especie es de carácter hemotóxico, es decir, que provoca hemólisis, coagulación y daño de tejidos. El veneno está constituido por enzimas coagulantes y otros componentes como la fosfolipasa A2 que en conjunto alteran la cascada de coagulación (Betancourt, 2012). La cascada de coagulación (Figura 2) está formada por dos vías las cuales son la intrínseca y extrínseca que unidas forman una vía en común que formara un coágulo de fibrina, estas dos vías con la ayuda de los factores de coagulación (Tabla 1) van hacer que la protrombina se transforme en trombina, de igual manera la trombina se transforma en fibrinógeno y finalmente el fibrinógeno se convierte en fibrina (Osorio, Quenán, & Gómez, 2013). Entre las enzimas más representativas del veneno están las metalo-proteinasas y serina-proteinasas,

hidrolasas, trombina y estereasas que provocan efectos en la sangre como la alteración de la hemostasis y trombosis sanguínea (Pazmiño & Torres, 2013). La hemostasis es un mecanismo de nuestro sistema de defensa el cual consiste en detener la pérdida de gran cantidad de sangre provocada por una lesión a nivel vascular (Páramo, 2012); este proceso de defensa inicia a los pocos segundos que se da una lesión vascular activando así la cascada de coagulación y la trombosis sanguínea consiste en que se forman coágulos o trombos en el interior de las paredes de los vasos sanguíneos provocando una obstrucción a nivel vascular; la formación de los trombos está relacionada por alteraciones en la pared vascular de los vasos sanguíneos y por cambios en la cascada de coagulación (Bustamante & Ticona, 2014).

Cascada de coagulación

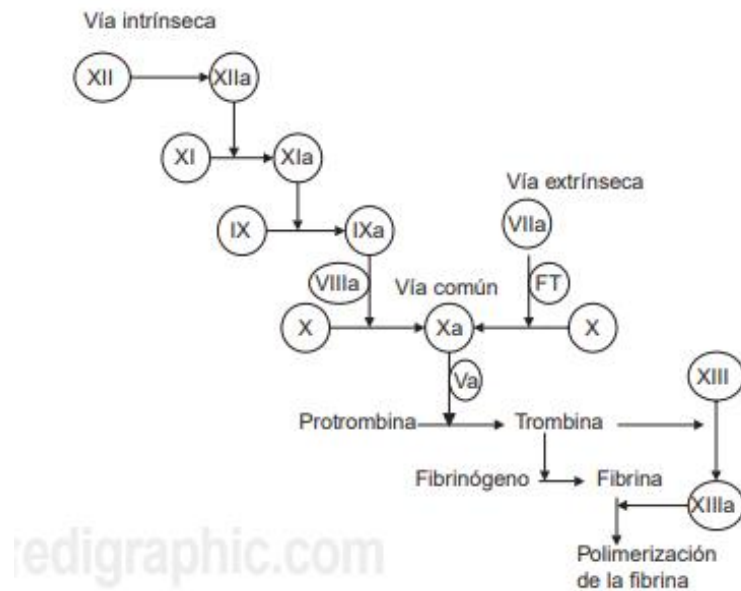


Figura 2. Esquema de la cascada clásica de coagulación. Se basa principalmente en dos vías la intrínseca y extrínseca que en conjunto con los factores de coagulación van a polimerizar la fibrina dando como resultado la formación de un coágulo.

Fuente: Martínez, C. (2006). Mecanismos de activación de la coagulación. Rev Med Inst Mex Seguro Soc, 44(2), 51–58.

Tabla 1.

Factores de coagulación

Factor	Nombre
I	Fibrinógeno
II	Protrombina
III	Tromboplastina
IV	Calcio
V	Proacelerina
VII	Proconvertina
VIII	Factor Antihemofílico A
IX	Factor Antihemofílico B
X	Factor de Stuart-Prower
XI	Antecesor tromboplástico del plasma
XII	Factor de Hageman
XIII	Factor estabilizante de la fibrina

Fuente: Tomado de Osorio et al. (2013)

Nota: elaborado por la autora, 2018

Las enzimas proteolíticas, hemorrágicas y citotóxicas del veneno de *B. atrox* ocasionan lisis celular y en respuesta a eso el organismo activa su sistema de defensa originando un proceso de inflamación dando como resultado el empeoramiento de la situación; que a partir de esto va a existir un aumento en la presión tisular desencadenando varios problemas como aparición de edemas y destrucción de las células que si no se controlan a tiempo puede terminar en necrosis (Córdova, G, & Santos, 2013).

1.3.3 Efectos del veneno de *Bothrops atrox*

1.3.3.1 Acción proteolítica

La proteólisis es la degradación de una proteína por hidrólisis en uno o más de sus enlaces peptídicos (Alberts et al., 2002). Este proceso se da por la presencia de enzimas proteolíticas presentes en el veneno cuya función es provocar la descomposición de

los componentes estructurales de los tejidos por medio de liponecrosis, mionecrosis y necrosis vascular (Gualán, 2011). El efecto necrosante se ve favorecido por la presencia de sustancias vasodilatadoras como la bradicina cuya función principalmente es aumentar la permeabilidad de los vasos y estimular la hematoxicidad dando como resultado un enrojecimiento de la piel y además provoca la disminución del flujo sanguíneo; estas sustancias vasodilatadoras hacen que las hialuronidasas, las metaloproteinasas y las fosfolipasas sean las responsables de la destrucción de los tejidos (D. López, 2013).

Las hialuronidasas son las responsables de facilitar la propagación del veneno ya que provocan las reacciones que rompen los enlaces de mucopolisacáridos en el tejido conectivo (Mencías Rodríguez & Mayero Franco, 2000). Las fosfolipasas descomponen los fosfolípidos de las membranas de las células provocando que se rompan y mueran (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2003).

Es por tal razón que la proteólisis que produce el veneno también está relacionada con las metaloproteinasas (Gutiérrez, 2015); originalmente las metaloproteinasas se unen e hidrolizan los componentes de los vasos capilares de la membrana basal provocando un debilitamiento en la pared capilar que desencadena en una hemorragia, además también provocan la interrupción capilar dando como resultado la inflamación de los tejidos afectados (Baldo, Jamora, Yamanouye, Zorn, & Moura-da-Silva, 2010).

En respuesta al daño del tejido se desencadena una reacción inflamatoria lo cual va a convertir al tejido dañado en un lugar propicio para el desarrollo de varios microorganismos (D. López, 2013).

1.3.3.2 Acción coagulante

La coagulación resulta de la interacción de proteínas sanguíneas, componentes de la sangre y componentes de la pared vascular (Martinuzzo, 2017); esta interacción hace que la sangre pierda su estado líquido convirtiéndose en estructuras sólidas semejantes a un gel (S. López, 2016). Las plaquetas, los monocitos y las células endoteliales son muy importantes para la coagulación sanguínea (C. Martínez, 2006).

Sin embargo el veneno contiene enzimas que actúan sobre las proteínas que se encargan de la coagulación de la sangre (Alperin et al., 2015). Esta acción principalmente ocurre por una enzima denominada Batroxobina que es una serina proteasa la cual tiene una actividad semejante a la trombina cuya función es hacer que se formen coágulos que posteriormente producirán necrosis y embolias (Córdova, G, & Santos, 2013). Además la víctima puede presentar un (CID) Coagulación Intravascular Diseminada que esto se da cuando se activa el factor X de la coagulación provocando un aumento de consumo de plaquetas y de factores V y VII; lo que llevarían a la persona a tener más complicaciones como insuficiencia renal, sangrado y problemas en el sistema nervioso y respiratorio (Gualán, 2011).

De igual manera otra de las enzimas que participa en la coagulación de la sangre por efecto del veneno de *B. atrox* es la fosfolipasa A2 que de la misma forma actúa como trombina. Su función principal es que el fibrinógeno se transforme en fibrina dando como resultado la producción de coágulos (Córdova, G, & Santos, 2013) (Saravia et al., 2017). Estos coágulos pueden dirigirse a los pulmones y al tubo digestivo y posteriormente provocaran la muerte de la víctima.

1.3.3.3 Acción hemolítica

La hemólisis también llamada (eritrolisis) se define como la rotura de glóbulos rojos, es decir, que es la alteración de las membranas de los eritrocitos provocando la liberación de la hemoglobina (Di Terlizzi, 2012), la hemoglobina es una proteína globular muy importante ya que es la encargada de llevar oxígeno hacia los tejidos (Brandan, Aguirre, & Giménez, 2008).

La hemólisis provocada por la mordedura de serpientes es de tipo intravascular (en la circulación), es decir, que ocurre cuando los glóbulos rojos se destruyen dentro de la vasculatura principalmente en los vasos sanguíneos y el corazón (Di Terlizzi, 2012).

En efecto el veneno de *B. atrox* contiene enzimas que destruyen los glóbulos rojos haciendo que se provoque una hemorragia (Alperin et al., 2015), las hemorragias son causadas por daños endoteliales, que principalmente ocurren por enzimas similares a la trombina las cuales son las hemorrinas; estas metaloproteasas provocan daños capilares en distintos órganos y cuya función es que no se produzcan coágulos y a la vez inducen el aumento del dímero D en la sangre, siendo así que este dímero es el principal degradante de los coágulos (Báez, A.; Teibler, P.; Merlo, W.; Burna, A.; Acosta Badaró, M.; Solana, M.; Infuleski, R.; Acosta de Pérez, 2008).

De igual manera el veneno al interactuar con la sangre provoca dos mecanismos de hemólisis los cuales son:

- Hemólisis directa fenómeno por el cual el componente del veneno es el factor lítico directo (J. Jiménez, 2015).
- Hemólisis indirecta que es provocada por la fosfolipasa A2 y la lisolecitina que son las responsables de la fragilidad de los glóbulos rojos (J. Jiménez, 2015).

En fin los efectos producidos por el veneno en la hemólisis provocan (hemoglobinuria) que es la presencia de hemoglobina en la orina (Montoro, Segarra, López, & Monterde, 2013) y (metahemoglobinemia) que es la incapacidad de que la hemoglobina pueda transportar oxígeno (Sánchez, Izquierdo, & Hurtado, 2013); y como resultado pueden producir necrosis tubular aguda (Céspedes, Barco, & Arnez, 2011).

1.3.4 Accidente Bothrópico

El accidente bothrópico puede definirse como una lesión en la piel la cual ha sido provocada por la mordedura de víboras del género Bothrops provocando alteraciones en todo el organismo (Secretaría de Salud, 2017); estas alteraciones pueden ser locales o sistémicas (Tabla 2) así como también hay que tomar en cuenta que los niveles de gravedad (Tabla 3) de la mordedura van a depender de características de la serpiente como su edad, si es joven o adulto, e incluso el estado de la víctima como por ejemplo si posee enfermedades, la edad o algún otro tipo de alteración. No obstante si la víctima no es tratada a tiempo puede llegar a un nivel grave y causarle la muerte (Ferrari et al., 2011).

Tabla 2.

Cuadro clínico del accidente Bothrópico

Manifestaciones locales	Manifestaciones sistémicas
Inflamación, dolor, ampollas, edemas, necrosis	Coagulación sanguínea, hemorragias, nauseas, taquicardia, insuficiencia renal aguda, choque cardiovascular

Fuente: Tomado de Zamora (2015)

Nota: elaborado por la autora, 2018

Tabla 3.

Accidente Bothrópico según la gravedad

Niveles de gravedad Bothrópica	
Leve	Hemorragias, dolor y edemas
Moderado	Hemorragias locales y sistémicas, edemas duros
Grave	Hemorragias, dolor intenso, necrosis y edemas intensos

Fuente: Tomado de Ferrari et al. (2011)

Nota: elaborado por la autora, 2018

1.3.5 Tratamiento para la mordedura de ofidios Bothrónicos

El suero antiofídico es el único agente terapéutico contra las mordeduras de víboras. En Ecuador el suero antiofídico antibothrónico se produce por el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Leopoldo Izquieta Pérez de la ciudad de Guayaquil, este suero antiofídico se elabora con venenos de diferentes especies del género *Bothrops* como *B. asper*, *B. atrox* y *B. xanthogramma*; la capacidad de neutralización de este

suero antiofídico es de 25 mg de cada veneno por dosis de 10 mL y su presentación es de frascos de 10 mL los cuales deben ser conservados entre 4-8 °C (MSP de Ecuador, 2008).

Según menciona Zelaya & Díaz (2017) que de acuerdo a los niveles de gravedad las dosis por frascos de 10 mL a aplicarse son las siguientes:

- Nivel leve: 5 frascos
- Nivel moderado: 10 frascos
- Nivel grave: 15 frascos

Pero como todo agente terapéutico tiene sus consecuencias, pues tiene efectos que pueden provocar trastornos, además es muy costosa y no se encuentra en las manos de todos ya que la mayoría de accidentes por mordedura de ofidios se da en zonas rurales de difícil acceso (Kadir et al., 2015).

El uso del conocimiento ancestral de los nativos de ciertas comunidades, en especial de las amazónicas, para tratar accidentes ofídicos utilizando plantas locales es una alternativa que ha sido utilizada desde la antigüedad. De esta manera se podría prescindir de este conocimiento para salvar más vidas con el uso de la medicina tradicional. En la amazonia ecuatoriana existen una gran variedad de plantas para contrarrestar los efectos provocados por las mordeduras de víboras como por ejemplo *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf. elliptica*.

1.4 Plantas Alexíteras

Desde la antigüedad, muchas comunidades en el mundo han utilizado plantas en la medicina tradicional para el tratamiento de varias enfermedades. Entre los usos

importantes están las plantas con actividad anti viperinas o alexíteras que disminuyen los efectos provocados por picaduras de ofidios (Ramos, Ávila, & Morales, 2007).

1.4.1 Características de las plantas alexíteras

A las plantas alexíteras se les ha atribuido la capacidad de aliviar algunos síntomas como sangrado, dolor, inflamación e infecciones provocadas por la mordedura de los ofidios (Torres, Camargo, Ricciardi, Ricciardi, & Dellacassa, 2014). Se conoce que al menos existen 121 familias de plantas que se utilizan para dicho tratamiento, de las cuales se emplea toda la parte de la planta pero también se usan solo hojas, raíces, corteza, fruto o incluso en raras ocasiones las semillas (López & Pérez, 2009).

La aplicación de las plantas se efectúa de diferentes maneras como por ejemplo sobre las heridas se las aplica maceradas o también cocidas y para ser ingeridas o para lavar el área infectada se las aplica en forma de decocción, además se realizan infusiones para preparar bebidas e incluso a estas plantas se las puede mezclar con aguardiente simulando preparar extractos alcohólicos y dentro de las familias más importantes de plantas alexíteras están las Fabaceas, Euphorbiaceae, Rubiaceae, Asteraceae y Araceae (Torres et al., 2014). Estas plantas pueden aliviar o disminuir los efectos producidos por la picadura de las serpientes; pero los nativos que utilizan este tipo de antídotos antiofídicos usan vegetales de tipo calmante, como por ejemplo la adormidera (López & Pérez, 2009).

Alrededor del mundo se han aplicado extractos de diferentes plantas para el tratamiento contra la mordedura de serpientes como por ejemplo en Nigeria se ha utilizado *Diodia scanderas* (Rubiaceae) no solamente como antiofídico sino también como antihistaminico, en México se han utilizado desde la época prehispánica plantas

como el tabaco *Nicotiana tabacum*, en Ecuador los nativos amazónicos como los Colorados y Cayapas usan especies de Polypodiales, Fabaceas y Piperaceas; y los tratamientos con estas plantas van dirigidos principalmente contra el veneno de *Bothrops atrox*, *Lachesis muta* y *Micrurus* spp (Sumpa, 2012).

Es así que para que las plantas funcionen como alexitéricas deben poseer ciertos metabolitos que dentro de estos están los fenoles y flavonoides que se destacan como los más importantes; además también están los taninos ya que al parecer interactúan con las proteínas del veneno y así mismo también existen algunos alcaloides y triterpenos (J. López & Pérez, 2009), estos componentes activos se mencionan a continuación.

1.4.1.1 Componentes activos

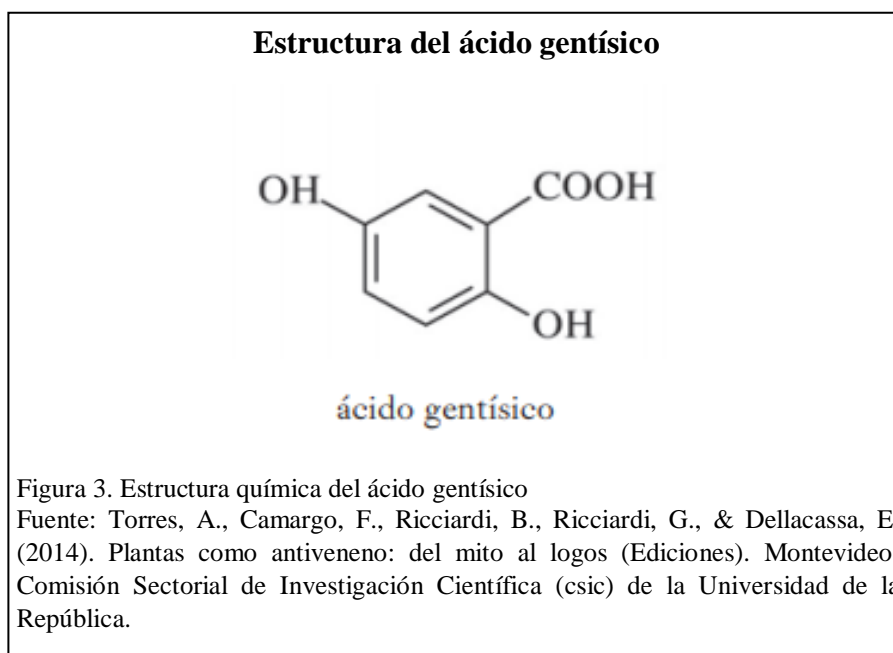
1.4.1.1.1 Fenoles

Los fenoles forman parte de un grupo muy amplio de sustancias que se encuentran en las plantas con estructuras químicas y actividades metabólicas distintas ya que se caracterizan por poseer un anillo aromático con grupos hidroxilo y además adquieren funciones como pesticidas naturales, agentes protectores de rayos UV y también se les da uso antibiótico. Además se les ha atribuido propiedades farmacológicas como efectos bactericidas, antiinflamatorios y vasodilatadores. (Porras & López, 2009).

Son constituyentes muy importantes de las plantas alexitéricas y se dividen de la siguiente forma (Torres et al., 2014):

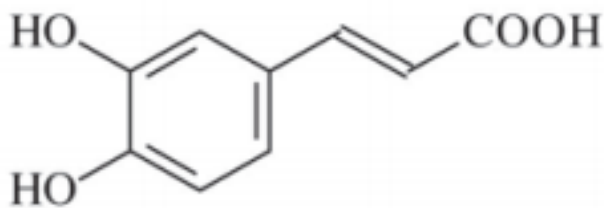
- Ácidos hidroxibenzoicos y sus éteres metílicos: se les atribuye capacidades anti hemorrágicas y anti coagulantes. El éster metílico se encuentra principalmente en especies de *Primula* y contiene propiedades

antiinflamatorias y además es un inhibidor de la tirosinasa; además el ácido gentísico (Figura 3) y el ácido protocatecuico también se los ha utilizado como antiveneno.



- Ácidos cinámicos y sus derivados: el más importante es el ácido cafeico (Figura 4) que posee propiedades de inhibir la lipoxigenasa y es antihepatotóxico, los ésteres del ácido cafeico han sido usados como antídotos contra los efectos de las mordeduras de las serpientes.

Estructura del ácido cafeico



ácido cafeico

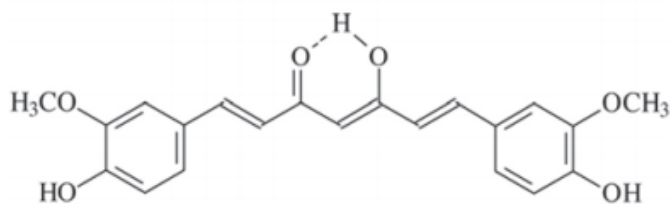
Figura 4. Estructura química del ácido cafeico

Fuente: Torres, A., Camargo, F., Ricciardi, B., Ricciardi, G., & Dellacassa, E. (2014). Plantas como antiveneno: del mito al logos (Ediciones). Montevideo: Comisión Sectorial de Investigación Científica (csic) de la Universidad de la República

1.4.1.1.2 Curcuminoides

Principalmente esta la curcumina que posee actividades como antiinflamatoria, hepatoprotectora, antimutagénica y anticarcinogénica.

Estructura de curcumina



curcumina

Figura 5. Estructura química de la curcumina

Fuente: Torres, A., Camargo, F., Ricciardi, B., Ricciardi, G., & Dellacassa, E. (2014). Plantas como antiveneno: del mito al logos (Ediciones). Montevideo: Comisión Sectorial de Investigación Científica (csic) de la Universidad de la República

1.4.1.1.3 Flavonoides

Los flavonoides son muy conocidos por su actividad antioxidante y son muy nombrados farmacológicamente por ser utilizados en tratamientos con problemas de inflamaciones, lesiones e infecciones que se dan en los seres humanos (Soto Vásquez, 2015). De modo idéntico a los fenoles se los utiliza en la medicina ya que se encuentran en la mayoría de ciertos medicamentos (Chavarro & Lozano, 2014), por otro lado también poseen propiedades que interfieren en el desarrollo de tumores ya que protegen al ADN de daños oxidativos. Cabe recalcar que estos son los metabolitos más abundantes en plantas superiores, y se los ha visto relacionados con el uso de las plantas en la medicina tradicional (Kougan, Tabopda, Kuete, & Verpoorte, 2013).

Todos los flavonoides poseen la misma estructura, es decir, que la proximidad del grupo hidroxilo fenólico sobre el C5 y el grupo carbonilo pirónico no va a cambiar (Figura 6). Desde el punto de vista antiveneno lo más importante que tienen los flavonoides es la capacidad que tienen de inhibir enzimas (Torres et al., 2014) como por ejemplo:

- Rutina: inhibe la fosfolipasa A2
- Quercitina: inhibe la lipoxigenasa
- Morina: se une a metales como Zinc y Aluminio

Estructura general de los flavonoides

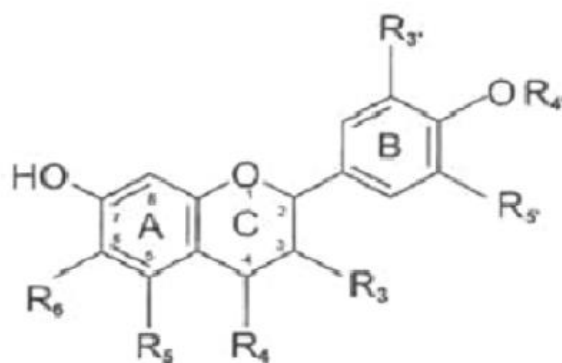


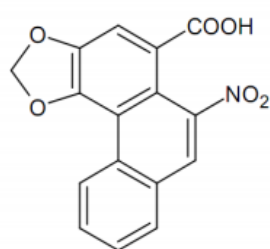
Figura 6. Estructura química general de los flavonoides

Fuente: Porras, A., & López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 121–134.

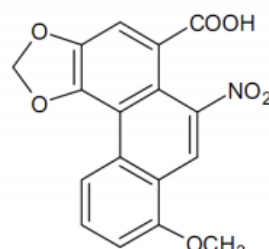
1.4.1.1.4 Alcaloides

El género *Aristolochia* es uno de los más conocidos por tener alcaloides como la alantoina y el ácido aristolóquico (Figura 7). (Cristovão, 2013), estudios realizados acerca del ácido aristolóquico demuestra que puede inhibir la actividad lítica de la fosfolipasa A2 del veneno de los ofidios especialmente de *Trimeresaurus flavoviridis* y *Vipera Ruselli* (Sumpa, 2012), además inhibe la inflamación provocada por agentes inmunológicos y agentes no inmunológicos (Torres et al., 2014).

Estructura del ácido aristolóquico



ÁCIDO ARISTOLÓQUICO I



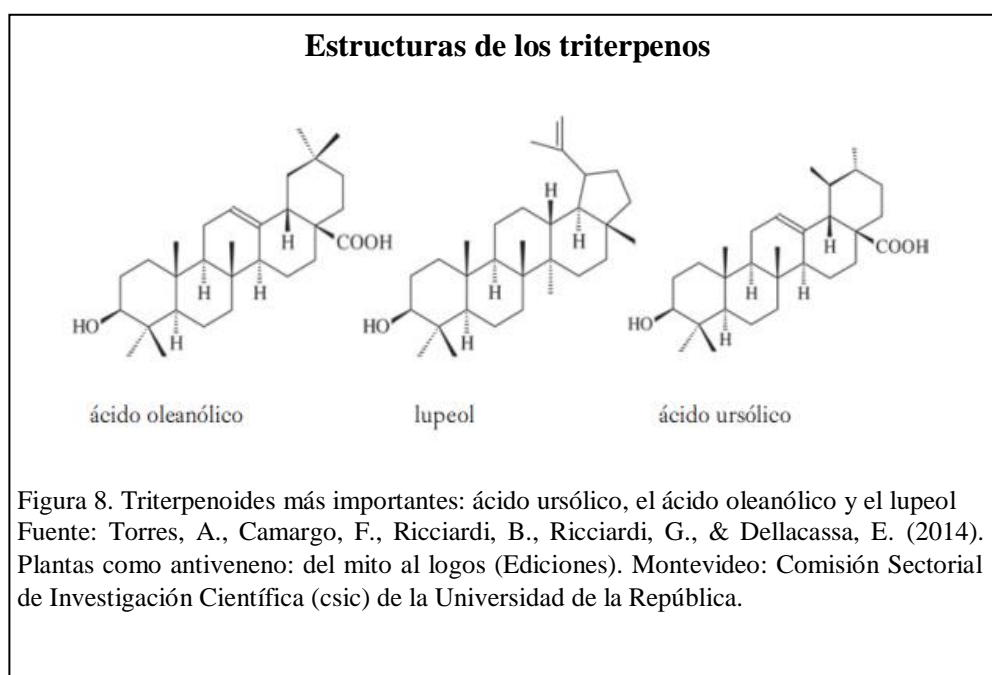
ÁCIDO ARISTOLÓQUICO II

Figura 7. Ácidos aristolóquicos presente en *Aristolochia*

Fuente: Cristovão, 2013. Cristovão, S. (2013). Contribuição Química para *Aristolochia trilobata* Volaris e obtenção de acetato de 6-metil-5-hepten-2-il por Biotransformação. Universidade Federal de Sergipe.

1.4.1.1.5 Triterpenos

Los triterpenos tetracíclicos poseen actividad antiinflamatoria y antifosfolipasa como los lanostanos; los triterpenos pentacíclicos igualmente tienen actividad antiinflamatoria y antiofídica. Entre los más importantes están el ácido ursólico, el ácido oleanólico y el lupeol (Figura 8). (Torres et al., 2014).



1.4.1.1.6 Taninos

Los taninos como el ácido tánico (Figura 9) (Abdel-shafy & Mohamed- Mansour, 2017) tienen la capacidad de formar complejos con las proteínas presentes en el veneno de los ofidios, por ejemplo en *Diospyros kaki* los taninos de esta planta neutralizan venenos neurotóxicos y hemorrágicos; en *Guiera senegalensis* las concentraciones altas de taninos presentan actividad inhibitoria sobre los efectos del veneno de *Naja nigricollis* (Torres et al., 2014).

Estructura del ácido tánico

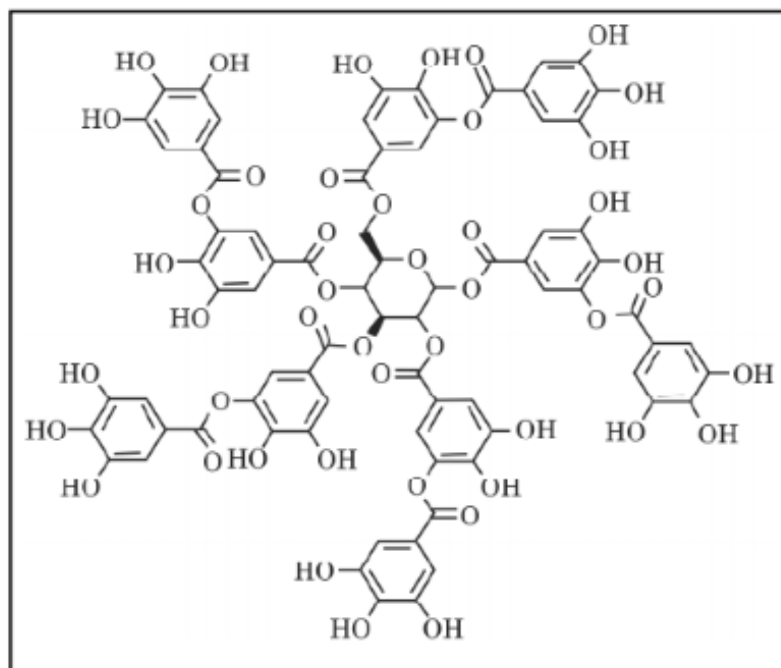


Figura 9. Estructura química del ácido tánico

Fuente: Abdel-shafy, H., & Mohamed- Mansour, M. (2017). Polyphenols: Properties, Occurrence, Content in Food and Potential Effects. *ResearchGate*.

En Ecuador no se ha realizado muchos estudios científicos acerca de las plantas alexíteras ya que lo que más se conoce es gracias a los conocimientos de los nativos indígenas de la Amazonia que los han aplicado en víctimas con mordeduras por ofidios especialmente en las zonas rurales; una de ellas es *Lonchocarpus utilis* que se ha utilizado en países de América del Sur como Ecuador, Venezuela, Colombia, Brasil, Perú y Guyana; principalmente como insecticida debido a su principal compuesto que es la rotenona, también contra infecciones de la piel, como veneno para peces y contra mordeduras de ofidios y es ahí que se la ha atribuido su poder alexitéro (Grandtner & Chevrette, 2013). *Mucuna elliptica* en Ecuador y Perú es utilizada por las comunidades indígenas de la amazonia para tratar los efectos de la mordedura de los ofidios, en

Brasil esta planta se la encuentra cerca del rio Amazonas y en la India han utilizado estas plantas para tratar enfermedades como el Parkinson (The New York Botanical Garden, 2018).

1.4.2 Actividad Alexítera

El término alexítero o alexitérico se deduce a aquella planta o plantas que tienen la capacidad de poder mitigar, disminuir o aliviar los efectos provocados por las mordeduras de las víboras o culebras venenosas sobre las víctimas, es decir, que prácticamente se las utiliza como tratamiento alternativo para las mordeduras del veneno de las víboras.

La manera en que actúan estas plantas con actividad alexítera se puede dar por ciertas toxinas o algunas enzimas ya que estas interactúan con ciertas proteínas del veneno haciendo que se alivie un poco los efectos provocados por la mordedura de los ofidios venenosos principalmente en Bothrops (Sumpa, 2012).

De tal manera que en la actualidad existen muchas variedades de plantas que ahora son efectivas frente a los efectos de las mordeduras de las serpientes (J. López & Pérez, 2009), de las cuales las dos plantas que se estudiaron son *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf. elliptica*.

1.5 Especies estudiadas

1.5.1 *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm (Barbasco)

1.5.1.1 Descripción

El barbasco es conocido como calampi, cumu, gordolobo, cube, coñape y timbó (BIOPAT, 2015), es un arbusto leguminoso (Moncerrate & Vergara, 2013), crece

hasta los 5 metros de altura, requiere de lugares abiertos y sus raíces se los utiliza después de los 4 años de edad (Masaquiza, 2015), es así que los habitantes amazónicos utilizan la raíz de esta planta principalmente para la pesca ya que tiene como principio químico a la rotenona, además de otros compuestos como los alcaloides y también las saponinas que son tóxicas para los peces, por esta razón se acostumbra a sumergirlas en los ríos esperando a que los peces hayan muerto por intoxicación de la rotenona (BIOPAT, 2015).

1.5.1.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica según el herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador se la detalla en la siguiente tabla.

Tabla 4.

Identificación taxonómica del Barbasco

Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novak ex Takht
Superorden	Rosanae Takht
Orden	Fabales Bromhead
Familia	Fabaceae Lindl
Género	<i>Lonchocarpus</i> Lindl
Especie	<i>Lonchocarpus utilis</i> A. C. Sm

Fuente: Tomado de Herbario QCA (2017) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Nota: elaborado por la autora, 2018

1.5.1.3 Usos

Prácticamente se la usa como control de plagas de insectos como por ejemplo larvas de mosquito y trípidos en la región amazónica de Perú (Ríos, 2012); es así que el efecto biocida del barbasco es eficiente cuando se usa la raíz triturada de esta planta. Aunque se debe de tener precaución al momento de utilizarla debido a su toxicidad (Mariños, Castro, & Nongrados, 2004). El componente principal que tiene *L. utilis* es la rotenona, este compuesto es extraído de las raíces de esta planta mediante solventes como acetona o éter; este efecto de insecticida se lo conoció desde el siglo XIX, la rotenona tiene acción paralizante sobre los insectos es menos rápida que otros compuestos como por ejemplo el piretro, también en la actualidad aún se siguen usando los polvos pertenecientes a la raíz de *L. utilis* contra los insectos que atacan a las verduras como el gusano de repollo y el escarabajo de frijol (BIOPAT, 2015).

Además se usa los polvos de la raíz de barbasco contra la sarna, los parásitos intestinales y también como desinfectante para la ropa; en Venezuela se ha utilizado esta planta en medicina contra parásitos intestinales (Grünwald, 2000). *L. utilis* es usada también en vacunos, cerdos, perros, ovinos y aves para controlar piojos, moscas y garrapatas (Masaquiza, 2015).

Esta planta principalmente se la exporta a Estados Unidos de América y a países de Europa como Inglaterra pero su uso está directamente relacionado como insecticida para aplicarlos en jardines y otro uso que se da es para conservar el pescado en los supermercados (Ríos, 2012).

De igual manera esta planta principalmente en Ecuador se utiliza para el tratamiento contra el veneno de *B. atrox* para disminuir la inflamación y la infección ocasionada por la mordida del ofidio (Sumpa, 2012).

1.5.2 *Mucuna cf. elliptica*

1.5.2.1 Descripción

Esta planta es originaria de América del Sur en países como Ecuador, Perú, Brasil y Bolivia, además se encuentra en Jamaica; contiene varios sinónimos como *M. inflexa*, *M. platycarpa* y *M. fawcettii* (Kewscience, 2017). Es una planta herbácea con hojas trifoliadas; presenta vainas que son sigmoideas, turgentes y acanaladas que están cubiertas de pelos rojizos; además la base del peciolo es muy amplia, las flores son bisexuales con pistilo simple y posee un solo estigma y estilo; en cuanto a la fruta ésta es leguminosa y las semillas están envueltas en una capa dura semejante a un reloj (Natarajan, Narayanan, & Ravichandran, 2012). *M. elliptica* presenta pelos de foliolos abaxiales densos, brácteas presentes y persistentes; su inflorescencia es umbeliforme, su florescencia va desde el mes de abril hasta agosto (Moura, Mansano, Torke, Lewis, & Tozzi, 2013). Hay que tener cuidado al momento de manipular esta planta ya que puede causar reacciones alérgicas e irritaciones en la piel, además esta planta crece en los bosques tropicales como en la región Amazónica del Ecuador; además es una planta que habita en cultivos abandonados (Sumpa, 2012), especialmente se desarrollan al borde de los ríos (The New York Botanical Garden, 2018).

1.5.2.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica según el herbario de la Pontifica Universidad Católica del Ecuador se la detalla en la siguiente tabla.

Tabla 5.

Identificación taxonómica del Wapaá

Clase:	Equisetopsida C. Agardh
Subclase:	Magnolidae Novák ex Takht.
Superorden:	Rosanae Takht.
Orden:	Fabales Bromhead
Familia:	Fabaceae Lindl.
Género:	<i>Mucuna</i> Adans
Especie:	<i>Mucuna elliptica</i> (Ruiz&Pav.) DC.

Fuente: Tomado de Herbario QCA (2017) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Nota: elaborado por la autora, 2018

1.5.2.3 Usos

Las semillas se usan como astringentes, como afrodisiacos y para tratar algunas parálisis; además las raíces se las utiliza como astringentes y diuréticas; en cuanto a accidentes por picaduras de las víboras se las utiliza como antiofídicas y es muy utilizada por los nativos amazónicos; también tiene propiedades en la medicina ya que es usada para tratar enfermedades como el Parkinson (Natarajan et al., 2012).

Los peruanos han utilizado las semillas de esta planta ya que posee propiedades purgativas (Towle, 2017). *M. elliptica* además de poseer propiedades naturistas o medicinales los nativos indígenas de Perú cuentan que se usan las raíces de esta planta como complemento dietético (MNHN, 2018)

Sin embargo los nativos de la amazonia ecuatoriana mencionan que para que funcione el tratamiento contra la mordedura de víboras consiste en que esta planta se la tome en un solo bocado, dos veces al día (Sumpa, 2012).

Capítulo II:

Materiales y métodos

2.1 Diseño

En esta investigación se elaboraron dos tipos de extractos: alcohólico (96 % alcohol etílico) sugerido por FarmaQuímica Sur (2018) y heptánicos (n-heptano total) técnica sugerida por INSHT (2007). Los extractos alcohólicos y heptánicos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf elliptica* fueron usados para los estudios sobre la actividad anti proteolítica, anti hemolítica y anticoagulante, con el fin de determinar la actividad neutralizante de estas especies vegetales. Además se determinó la concentración de fenoles y flavonoides en las especies vegetales mediante espectrofotometría UV y la variación en el perfil proteico del veneno de *Bothrops atrox* mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

2.2 Material vegetal

Se trabajó con dos muestras vegetales que fueron recolectadas en Huamboya cuyas coordenadas son: Latitud: 01° 56' 44" Sur y Longitud: 77° 59' 27" Oeste y en Morona cuyas coordenadas son: Latitud: 2°18'00" Sur y Longitud: 78°07'00" Oeste, estos puntos se encuentran en la provincia Morona Santiago, estas han sido reportadas por comunidades indígenas que tienen propiedades neutralizantes contra la picadura de la serpiente "equis".

Las especies utilizadas fueron *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf elliptica*. En la Tabla 6 se muestran las partes de la planta que se usaron para realizar los extractos.

Tabla 6.

Partes de la planta que se usaron para elaborar los extractos secos

Especie	Parte de la planta
<i>Lonchocarpus utilis</i>	Raíz
<i>Lonchocarpus utilis</i>	Hojas
<i>Mucuna cf elliptica</i>	Hojas

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Las muestras vegetales fueron puestas y envueltas en papel periódico correctamente etiquetadas y se las colocó en fundas plásticas para luego ser transportadas hasta el laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana en la ciudad de Quito.

2.3 Veneno

Se utilizó veneno extraído de un ejemplar adulto de *Bothrops atrox*, que se diluyó en suero fisiológico en proporción 1:2 y se conservó a -20 °C para su posterior uso.

2.4 Preparación de extractos

A las muestras vegetales se las limpió, lavó y desinfectó con hipoclorito de sodio al 1 % durante 5 minutos; posteriormente fueron secadas en una estufa a 37 °C por 5 días.

Las hojas de *L. utilis* y *M. elliptica* fueron pulverizadas en un molino eléctrico directamente, mientras que la raíz de *L. utilis* debido a su grosor primero tuvo que ser cortado manualmente en pedazos pequeños y luego fue pulverizada en el molino eléctrico; una vez finalizada la molienda cada muestra fue guardada en sobres tipo manila.

Después de la molienda se preparó los extractos totales secos mediante la técnica de maceración que consistió en colocar en un recipiente con tapa el material molido con

los respectivos solventes; este proceso se lo realizó a temperatura ambiente durante un periodo de 48 horas; pasado ese tiempo el líquido se filtró y se recuperó el solvente por medio de sequedad en una estufa con temperatura de 60 °C obteniendo así el extracto seco (González, 2004). Los extractos realizados son:

2.4.1 Extracto alcohólico

Se pesó una cantidad de 15 g de cada muestra vegetal pulverizada y se las colocó en vasos de precipitación, posteriormente a las muestras se les adicionó 50 mL de alcohol etílico al 96 % y se dejó en reposo por 48 horas, luego el líquido se filtró mediante papel filtro estándar con diámetro de 11 µm; este proceso se lo realizó por triplicado; finalmente se recuperó el líquido llevándolo a sequedad en estufa con temperatura de 45 °C; obteniendo así el extracto seco.

2.4.2 Extracto heptánico

Similar a la extracción con alcohol, se pesó 15 g de la muestra vegetal y se adicionó 50 mL de n-heptano al 97 % y se dejó en reposo por 48 horas, posteriormente se filtró el líquido con papel filtro; este proceso se lo realizó por triplicado. Finalmente se obtuvo el extracto llevando el líquido a sequedad en estufa con temperatura de 45 °C y se lo almaceno para su posterior uso.

Cabe mencionar que para utilizar los extractos secos en los diferentes análisis realizados estos fueron disueltos nuevamente con el respectivo solvente utilizado en la extracción,

2.5 Determinación de fenoles

La cuantificación de fenoles totales se lo hizo mediante espectrofotometría utilizando la metodología propuesta por Ortiz, Gutiérrez, & Olmos (2015) en el que se usó el

reactivo de Folin-Colcateu que es una solución de color amarillo que está formada por fosfotungstato-molibdatos que al hacer contacto con los fenoles de las muestras ocurre una reacción de óxido-reducción en medio básico; este medio se ajusta con la adición de carbonato de sodio y como resultado de esta oxido-reducción se da una coloración azulada la cual puede ser determinada mediante espectrofotometría.

2.5.1 Curva de calibración de fenoles totales

Para la realización de la curva de calibración se utilizó la misma metodología que menciona Ortiz et al., (2015) en la que se usó el ácido gálico como molécula de referencia. Para la curva de calibración de fenoles se usó como solución estándar ácido gálico (0.1 mg/mL), además de la solución estándar se utilizó soluciones en intervalos de 20 µL que van desde 0 µL, 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL, 100 µL, 120 µL y 140 µL las cuales se fueron aforando con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 500 µL. Se añadió 250 µL del reactivo de Folin-Colcateu llevando a ultrasonido por un periodo de 5 minutos. Posteriormente se adicionó 1250 µL de Na₂CO₃ al 20 %, esta mezcla se dejó reposar por un periodo de 2 horas y se midió la absorbancia a 765 nm por triplicado en un espectrofotómetro UV (JASCO V-730). Para el blanco se utilizó 500 µL de agua destilada, 250 µL de Folin-Colcateu dejándolo en ultrasonido por un periodo de 5 minutos; se adicionó 1250 µL de Na₂CO₃ al 20 % y se dejó por 2 horas reposando a oscuridad. En la Tabla 7 se muestra los datos para la curva de calibración de ácido gálico, los valores se muestran en el Anexo 5 más detalladamente y el gráfico de la curva en el Anexo 6.

Tabla 7.

Datos para la curva de calibración de ácido gálico

Muestras	Solución de Ácido gálico (mL)	Absorbancias (nm)	Ácido gálico (ppm)
Blanco	0	0.0000	0.00
1	0.02	0.0545	0.50
2	0.04	0.0863	1.00
3	0.06	0.1672	1.50
4	0.08	0.2644	2.00
5	0.1	0.3251	2.50
6	0.12	0.3793	3.00
7	0.14	0.4435	3.50

Nota: Elaborado por la autora, 2018

2.5.2 Cuantificación de Fenoles totales

Para la cuantificación de fenoles totales en los extractos, primero se tomó 1mg de extracto seco y se lo disolvió con 25mL de cada solvente correspondiente ya sea alcohol etílico al 96 % o n-heptano, esta mezcla se la agitó hasta que quede homogénea. Luego en un balón de aforo se colocó 100 μ L de dicha mezcla y se completó con 400 μ L de agua destilada, se agitó y se añadió 250 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó para que se mezcle con ese reactivo; después se lo dejó reposar en el ultrasonido por 5 minutos. Luego de transcurrido ese tiempo se añadió 1250 μ L de Na_2CO_3 al 20 % y se dejó reposar por 2 horas manteniéndolo en obscuridad. Finalmente se midió la absorbancia a 765 nm por triplicado en el espectrofotómetro UV. Para calcular el contenido de fenoles totales se utilizó la Ecuación 1.

Ecuación 1. Cálculos para determinar los fenoles totales en extractos secos

$$Cantidad\ de\ fenoles = \frac{Absorbancia\ muestra - b}{m}$$

$$C = ppm = mg/l$$

Nota: Tomado de Mora (2015)

2.6 Determinación de flavonoides

Para el análisis de flavonoides se utilizó la quercetina como molécula de referencia. Esta molécula es uno de los flavonoides más importantes debido a que se encuentra relacionada con aplicaciones terapéuticas como acciones antiinflamatorias (Muñoz, 2014), cicatrizante, antihistamínica, antibacterial y además posee función antioxidante que hace que el flavonoide pueda conservar sus funciones durante un periodo de tiempo más largo (Varas, 2004).

2.6.1 Curva de calibración para quercetina

Para la metodología de la curva de calibración de la quercetina se utilizó la técnica que redacta (Carrión & García, 2010): Para la solución madre de quercetina se pesó 2.7 mg y se aforó con etanol al 80 % hasta llegar al volumen del balón de 10 mL. De la solución madre se realizó soluciones en intervalos 100 µL, 175 µL, 350 µL y 700 µL en distintos balones de aforo de 10 mL. Se le añadió 200 µL de Nitrato de aluminio al 10 %, luego se adicionó 200 µL de Acetato de potasio 1 M, esta mezcla se dejó reposar por 40 min y se aforó con etanol al 80 % hasta alcanzar los 10 mL del balón. Finalmente se midió la absorbancia a 415 nm por triplicado en un espectrofotómetro UV (JASCO V-730). Para el blanco se utilizó etanol al 80 % en un balón de 10 mL, se colocó 200 µL de Nitrato de aluminio al 10 %, luego se colocó 200 µL de Acetato de potasio 1 M, se dejó reposar por 40 min y se midió la absorbancia a 415 nm por

triplicado. En la Tabla 8 se muestra los datos para la curva de calibración de quercetina, los valores detallados y el gráfico de la curva se muestran en el Anexo 8 y Anexo 9 respectivamente.

Tabla 8.

Datos para la curva de calibración de quercetina

Muestras	Solución de quercetina (mg)	Absorbancia (nm)	Quercetina (ppm)
Blanco	0	0	0
1	0.027	0.1510	0.0304
2	0.047	0.2371	0.0457
3	0.094	0.4480	0.0833
4	0.189	1.0703	0.1942

Nota: Elaborado por la autora, 2018

2.6.2 Cuantificación de flavonoides

Para cuantificar flavonoides se utilizó la técnica que se describe en Carrión & García (2010). Se disolvió 0.1 mg de extracto seco en 600 μ L del respectivo solvente, después se agitó la mezcla para que quede homogénea. Posteriormente, se tomó 200 μ L de cada extracto disuelto y se lo colocó en frascos ámbar. Después de esto se añadió 100 μ L de Nitrato de Aluminio al 10 % y 100 μ L de Acetato de potasio 1M. Finalmente se aforó a 5 mL con el solvente alcohólico o heptánico y se lo dejó en reposo por 40 min, pasado este tiempo se midió la absorbancia en un espectrofotómetro con longitud de onda de 415 nm, este proceso se lo realizó por triplicado. La cuantificación de flavonoides totales se la expresó en ppm y se la calculó con la Ecuación 2.

Ecuación 2. Cálculos para determinar los flavonoides totales en extractos secos

$$Cantidad\ de\ flavonoides = \frac{Absorbancia-b}{m}$$

$$C=ppm=mg/l$$

Nota: Tomado de Mora (2015)

2.7 Actividad coagulante

Se fundamenta en determinar el tiempo de coagulación o gelificación del plasma por observación de flóculos de coagulación iniciales sobre la pared de un vidrio reloj, tal como se muestra en el Anexo 11 a 13 donde se observa la coagulación del plasma con el veneno de *B.atrox* y con el tratamiento con extractos vegetales. La reproductibilidad y repetitividad dependen enormemente del operario (Zambudio, 2015).

2.7.1 Dosis mínima de coagulación (DMC)

Para calcular la DMC se realizaron diferentes soluciones de veneno de *B. atrox*: 1.07 µL, 0.6955 µL, 0.0535 µL, 0.0428 µL, 0.035 µL diluidos en 50 µL de PBS. Después estas soluciones y 1800 µL del plasma sanguíneo se incubaron por 30 minutos a 37 °C. Luego de acabado ese tiempo se colocó 300 µL de plasma humano para cada una de las distintas soluciones de veneno sobre un vidrio reloj, finalmente se esperó a que en cada solución se forme el primer coágulo midiendo el tiempo de coagulación con un cronómetro y para determinar la dosis mínima de coagulación del veneno se esperó a ver cuál de las soluciones es la que primero formó el coágulo en 60 segundos ya que en la metodología de Theakston (1983) se define que aquella solución de veneno que forme el primer coagulo en 1 minuto es la dosis mínima de coagulación.

2.7.2 Prueba de anti coagulación

Se determinó el tiempo de coagulación del plasma sanguíneo humano mediante la técnica de (Theakston & Reid, 1983) que consistió en:

- Obtener el plasma a partir de sangre humana sometiéndola a centrifugación a 3500 rpm durante 30 minutos.
- Pasado ese tiempo se obtuvo el sobrenadante con el cual se trabajó todas las pruebas de actividad biológica.
- Posteriormente siguiendo la técnica se usó como control positivo una solución de 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de veneno de *B. atrox* contenido en 50 μL de PBS que fue preincubado a 37 °C por 30 minutos, así para medir el tiempo de coagulación del control positivo se colocó 300 μL de plasma sobre un vidrio de reloj y se esperó a que se forme el primer coágulo.
- Para los ensayos de inhibición se utilizó soluciones que se incubaron a 37 °C por 30 minutos que contenían 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de veneno y 15 μL de extracto disuelto.
- Luego se colocó sobre los vidrios reloj 300 μL de plasma con la solución del veneno previamente incubada y por último se tomó el tiempo para evidenciar cuanto se demoró en coagularse el plasma humano con las soluciones. Es así que se obtuvo el tiempo de coagulación del control positivo (60 segundos aproximadamente) y el tiempo de coagulación con los extractos (> 60 segundos).

2.8 Determinación de la Actividad anti hemolítica

2.8.1 Obtención de glóbulos rojos (eritrocitos)

Para la obtención de eritrocitos lavados se centrifugó la sangre humana en tubos de 50 ml por 15 minutos a 3000 rpm con 32 mL de solución salina, posteriormente pasado este tiempo se retiró el plasma para así obtener el primer lavado, nuevamente se volvió a añadir 32 mL de solución salina a los tubos de sangre y se colocó en la centrifugadora por otros 15 minutos para el segundo lavado, de igual manera se retiró con una pipeta el plasma con mucho cuidado de no aspirar los eritrocitos; se repitió el proceso hasta obtener un tercer lavado en el cual se removió el plasma y los glóbulos blancos con cuidado hasta obtener el pellet rojo de interés (Hermosilla & Hernández, 2014).

2.8.2 Método hemolítico por espectrofotometría

Se utilizó la técnica descrita por Gutiérrez, Chaves, & Bolaños (1980), en la cual en tubos de ensayo se colocó 0.1 mL de suspensión de yema de huevo, 2.9 mL de solución salina pH 7.2, 1 mL de eritrocitos humanos lavados, 1 mL de la solución de veneno y además se adicionó 15 µL del extracto correspondiente. Posteriormente la mezcla se incubó por un periodo de 30 minutos a 37 °C y pasado este tiempo finalmente se leyó la hemoglobina liberada del sobrenadante con una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro UV.

El mismo proceso se realizó para el blanco positivo, pero este contenía 0.1 mL de suspensión de yema de huevo, 2.9 mL de solución salina a pH 7.2, 1 mL de veneno y 1 mL de eritrocitos humanos lavados. Todo este proceso se lo hizo por triplicado. De la misma forma se hizo el blanco negativo el cual contenía 2.9 mL de solución salina, 0.1 mL de suspensión de yema de huevo y 1 mL de eritrocitos.

Para determinar el porcentaje de hemólisis se tomó al blanco positivo como 100 % de la hemoglobina liberada y para determinar la efectividad de la actividad anti hemolítica de los extractos se los fue comparando a cada uno con el blanco positivo, ya que cuando va bajando el porcentaje de hemólisis es que los extractos vegetales tienen más efecto sobre el veneno, es así que los porcentajes de hemólisis se determinó mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 3. Fórmula para determinar el porcentaje de hemoglobina liberada

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{A}{b} \times 100$$

Nota: tomado de Hermosilla & Hernández (2014)

Dónde: A: absorbancia de las muestras; b: absorbancia del blanco

2.9 Determinación de actividad anti proteolítica

Se utilizó la técnica definida por Lomonte & Gutiérrez (1983) en donde adisolución de caseína al 1 % con PBS se le adicionó 1 ml de solución de veneno (0.1 mg/mL) y se añadió 15 µL de cada extracto alcohólico o heptánico; después la mezcla se incubó a 37 °C por 30 minutos, pasado este tiempo la reacción fue detenida con 4 mL de ácido tricloroacético (ATA) al 5 %. Posteriormente se dejó reposar a temperatura ambiente por unos 30 minutos y luego los tubos fueron centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos para luego determinar la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en un espectrofotómetro UV. De la misma manera se realizó la metodología para el blanco positivo el cual contenía veneno + caseína + ATA. Todo este proceso se lo hizo por triplicado.

Se calculó las Unidades/mg de la actividad proteolítica mediante la Ecuación 4.

Ecuación 4. Actividad proteolítica en Unidades/mg

$$U/mg = \frac{\Delta \text{Absorbancia (280)}}{mg \text{ veneno}} \times 100$$

Tomado de Lomonte & Gutiérrez (1983)

2.10 Determinación del perfil proteico (SDS PAGE)

La técnica SDS-PAGE aplicada al veneno de serpientes permitirá establecer el número de bandas separadas correspondientes a diferentes proteínas de acuerdo a su peso molecular. Para determinar los cambios en el perfil electroforético del veneno en relación con los extractos se usó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), como lo indica Laemmli (1970):

2.10.1 Preparación de reactivos

Tabla 9.

Solución tampón TRIS-HCl 1.5 M

Tris-base 18.17 g disueltos en 80 mL de agua destilada
Ajustar a pH 8.8
Aforar hasta 100 mL con agua destilada

Fuente: tomado de Maldonado & Jorrín (2001)

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Tabla 10.

Solución tampón TRIS-HCl 0.5 M

Tris-base 6.05 g disueltos en 80 mL de agua destilada
Ajustar a pH 6.8
Aforar hasta 100 mL con agua destilada

Fuente: tomado de Maldonado & Jorrín (2001)

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Tabla 11.

Solución SDS 10 %

SDS 10 g
Disolver en 80 mL de agua destilada
Aforar hasta 100 mL con agua destilada

Fuente: tomado de Maldonado & Jorrín (2001)

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Tabla 12.

Persulfato de amonio APS 10 %

APS 1 g disueltos en 5 mL de agua destilada
Disolver en 80 mL de agua destilada
Aforar hasta 10 mL con agua destilada

Fuente: tomado de Maldonado & Jorrín (2001)

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Tabla 13.

Poliacrilamida 30 %

Acrilamida 29.2 g
Bis acrilamida 0.8 g
Aforar hasta 100 mL con agua destilada

Fuente: tomado de Maldonado & Jorrín (2001)

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Tabla 14.

Composición de los geles

Componentes	Gel de resolución 12 %	Gel de apilamiento 5 %
Agua destilada	3.3 mL	3.4 mL
Poliacrilamida 30 %	4 mL	830 µL
Tris 1.5 M/ Tris 1 M	2.5 mL	630 µL
SDS 10 %	100 µL	50 µL
Persulfato de amonio	100 µL	50 µL
TEMED	20 µL	10 µL

Fuente: tomado de Maldonado & Jorrín (2001)

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Tabla 15.

Tampón de electroforesis 10 X Tris Glicina

Tris base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
Disolver en 800 ml de agua destilada	
Ajustar a pH 8.3 con solución de Hidróxido de sodio 2N	
Aforar con agua destilada hasta 1litro	

Fuente: tomado de Maldonado & Jorrín (2001)

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Tabla 16.

Tampón de muestra

Tris HCl 0.5 M	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10 %	1.6 mL
Azul de bromofenol	0.4 mL
2 mercaptoetanol	0.4 mL
Agua destilada	3 mL

Fuente: tomado de Maldonado & Jorrín (2001)

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Tabla 17.

Tampón de electroforesis 1X Tris Glicina

100 mL de Solución concentrada 10 X
Aforar hasta 1 litro con agua destilada

Fuente: tomado de Maldonado & Jorrín (2001)

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Tabla 18.

Solución decolorante de los geles

Ácido acético	100 mL
Metanol	400 mL
Aforar con agua destilada hasta 1 litro	

Fuente: tomado de (Maldonado & Jorrín, 2001)

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Tabla 19.

Solución de azul de Commassie

Etanol 96 %	450 mL
Ácido acético glacial	50 mL
Agua destilada	500 mL
Azul de Commassie	2.5 g

Fuente: tomado de Maldonado & Jorrín (2001)

Nota: Elaborado por la autora, 2018

2.10.2 Preparación de muestras

- Veneno patrón (VP): se utilizó 1.07 μ L de veneno de *B. atrox* con 300 μ L del tampón de muestra.
- Veneno-Extracto: se colocaron 1.07 μ L de veneno en 40 μ L de solución fisiológica y se mezcló para homogenizar; además a esta mezcla se adicionó cantidades de extractos alcohólicos o heptánicos según sus densidades relativas como se muestra en la Tabla 20 y se colocó 60 μ L de n-heptano o alcohol etílico al 96 % dependiendo el caso; luego estas mezclas se incubaron a 37 °C por 30 minutos y posteriormente se adicionó 100 μ L del tampón de muestra.
- Proteína patrón (PP): se mezcló 5 μ L del estándar de la proteína (Thermo Fisher) con 15 μ L del tampón de muestra.
- Todas estas muestras se incubaron a 100 °C por un lapso de 5 minutos para que ocurra la desnaturalización de las proteínas.
- Finalmente las muestras se corrieron en una cámara electroforética a 220 voltios y 90 mA.

Tabla 20.

Densidades relativas y la cantidad en microlitros de los extractos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm (Barbasco) y *Mucuna cf elliptica* (Wapaá)

Extracto	Especie vegetal	Densidad relativa	μL
Heptánico	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	0.6442	10.87
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	0.6634	10.55
	<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	0.5192	13.48
Alcohólico	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	1.0576	6.62
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	0.8846	7.91
	<i>Mucuna cf. elliptica</i> (raíz)	0.6826	10.25

Nota: Elaborado por la autora, 2018

2.10.3 Preparación de geles

- Se preparó el gel de resolución y apilamiento de acuerdo a la Tabla 14 y a estas mezclas se añadió Persulfato de amonio (APS) y se dejó en reposo por 5 minutos para posteriormente añadir el TEMED.
- Con los peines se hizo una marca de referencia en los vidrios del sistema y se señaló 1 cm debajo de los peines para llenar hasta esa altura con el gel de resolución.
- Se agregó TEMED al gel de resolución y se mezcló bien sin hacer burbujas, luego la mezcla se cargó al sistema electroforético hasta la marca que se realizó con los peines; después se agregó 1 ml de etanol 70 % y se dejó en reposo hasta que el gel polimerice.
- Después de un tiempo aproximado de 15 minutos se retiró el exceso de etanol con un papel filtro con mucho cuidado para evitar que se dañe el gel de resolución.

- Así mismo se añadió TEMED al gel de apilamiento y se mezcló sin hacer burbujas, una vez realizada la mezcla se llenó la cámara de electroforesis hasta el borde de las placas de los vidrios del sistema y por último se colocaron los peines y se dejó polimerizar el gel en un lapso de 15 minutos.

2.10.4 Preparación del sistema de ensamblaje y corrida

- Se colocó los vidrios que contienen el gel de resolución y apilamiento dentro del sistema de electroforesis bien ajustado para que no exista fugas de los geles durante la corrida
- Una vez colocados los vidrios de los geles dentro del tanque de electroforesis, se llenó la cámara con Tris Glicina 1X para poder sacar los peines que se dejaron en el gel de apilamiento con mucho cuidado sin dañar los pocillos donde se ubicaron las muestras
- Se cargaron las muestras en los pocillos de la siguiente manera: en la parte central el veneno patrón y la proteína patrón y a cada lado de éstas se colocaron cada una de las muestras veneno-extracto.
- Posteriormente se cerró la tapa del sistema y se corrieron las muestras a 220 voltios y 90 mA.
- Una vez finalizada la corrida se extrajeron los geles con mucho cuidado para que no se dañen y fueron lavados con agua destilada 3 veces.
- Después de los lavados, para la tinción de las proteínas se colocó azul de Commassie en un recipiente con los geles y se dejó por una hora en agitación.
- Transcurrido ese tiempo se lavaron los geles con agua destilada durante 3 minutos y se añadió 60 mL de solución decolorante para poder obtener un gel con bandas más visibles.

Para la determinación del peso molecular de las proteínas se utilizó la metodología de (Bioted, 2014) y la metodología de (Mendoza et al., 2009) con el gráfico de regresión lineal utilizando el RF (recorrido de las proteínas) versus el log PM (peso molecular) de la proteína patrón; con esos valores se obtuvo la Ecuación 5.

Ecuación 5. Se identificó las bandas de cada extracto y el veneno y se calculó su RF correspondiente hallando los pesos moleculares con su respectivo antilogaritmo.

Ecuación 5. Ecuación lineal de la recta

$$y = mx + b$$

Nota: Tomado de Infante (2002)

Siendo:

Y= log Peso Molecular; m= pendiente; x= RF encontrado; b= ordenada al origen

Capítulo III:

Resultados y Discusión

Los resultados de las pruebas de anticoagulación, anti proteólisis y anti hemólisis fueron analizados mediante las pruebas ANOVA y post-Hoc usando el programa estadístico InfoStat a un nivel de significancia de 0.05.

3.1 Rendimiento de los extractos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf elliptica*

Los valores para el cálculo de los rendimientos de los extractos alcohólicos y heptánicos se detallan en el Anexo 3 y Anexo 4. En la Tabla 21 se muestra de forma resumida el porcentaje de rendimiento de los diferentes extractos secos.

Tabla 21.

Porcentaje de rendimiento de los extractos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf. elliptica*

EXTRACTO ALCOHÓLICO		Peso de extracto obtenido (g)	(%) Rendimiento
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	0.586	3.90
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	1.100	7.20
	<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	0.313	2.05
EXTRACTO HEPTÁNICO		Peso de extracto obtenido (g)	(%) Rendimiento
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	0.330	2.26
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	0.610	4.00
	<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	0.142	0.94

Nota: elaborado por la autora, 2018

Se observó que el rendimiento de los extractos alcohólicos es mayor en comparación con los extractos heptánicos de la misma forma que ocurrió en las investigaciones de la actividad neutralizante de *L. utilis* y *M. elliptica* realizadas por Reyes (2017) y Cueva (2017) ya que en estos estudios los mejores rendimientos fueron para estas dos plantas pero al comparar a las dos mejores resulta que *L. utilis* es mucho mejor que *M. elliptica* debido a que se utilizó diferentes partes de las especies vegetales para esta investigación. El rendimiento de los extractos depende del tipo de solvente que se utilizó ya que según Fernández et al. (1994) y Carrión & García (2010) se obtienen mejores resultados de extracción para extractos secos con los solventes polares tales como el alcohol etílico al 96 %. Hay que tomar en cuenta que los extractos alcohólicos son solventes polares que tienen gran afinidad por ciertos compuestos como glucósidos, resinas, fenoles, flavonoides, entre otros y es por esa razón que son más solubles, es decir, que el alcohol al ser utilizado como disolvente polar este actúa cuando el soluto y solvente forman uniones como los puentes de hidrógeno y como las estructuras que se van a extraer de las plantas tienen mayor similitud entre sí, es decir que cuando el soluto y solvente tienen similares estructuras es cuando existe mayor solubilidad (Gennaro, Remington, & Belluci, 2003).

Por tal motivo los mejores porcentajes de extracción se obtuvo en los extractos alcohólicos y no tanto en los heptánicos; y evidentemente al reflejarse altos porcentajes de rendimiento en alcohol esto demuestra que al ser un componente polar este va a romper las membranas celulares y va a mejorar el proceso de la extracción (Garrido, Ortiz, & Pozo, 2013) y por consiguiente va a mostrar buenos resultados en cuanto a la presencia de metabolitos como fenoles y flavonoides; además por esta razón hay que aclarar que como menciona Gennaro et al. (2003) que cuando se utilizan solventes

como el n-heptano hay que tomar en cuenta que este es un disolvente apolar, es decir, que tiene más afinidad por sustancias con características apolares o insolubles en agua; es por eso que este disolvente se lo utiliza principalmente para extracción de aceites vegetales. Además Orozco (2004) en su investigación para la obtención de extractos demostró que obtuvo buenos resultados con los solventes de alta polaridad como por ejemplo etanol y otros solventes polares. En efecto los resultados son similares al estudio realizado por Tighe et al. (2016) el cual comparó el rendimiento de varios órganos de la planta *Capsicum annuum* y como resultado obtuvo que la raíz fue mejor que las hojas, esto quiere decir que es posible que la raíz puede ser una buena elección de material vegetal para obtener un buen rendimiento al momento de la extracción.

3.2 Análisis de fenoles totales

Se calculó los fenoles totales con la ecuación que está en el gráfico de la curva de calibración de ácido gálico (Anexo 6) y se obtuvo resultados confiables debido a que el coeficiente de correlación fue de $R= 0.9904$, es decir que los datos de las variables se encuentran bien correlacionados. Los valores de las absorbancias y contenido de fenoles se detallan mejor en el Anexo 7. En la Tabla 22 se muestra la concentración de fenoles de *L. utilis* y *M. elliptica*.

Tabla 22.

Datos de la concentración en ppm de fenoles en extractos alcohólicos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm (Barbasco) y *Mucuna cf. elliptica* (Wapaá)

Especie vegetal	Extracto	Absorbancia	mg /L (ppm)
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	Alcohólico	3.772	13.676
	Heptánico	0	0
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	Alcohólico	2.138	16.323
	Heptánico	0	0
<i>Mucuna elliptica</i> (hojas)	Alcohólico	1.257	9.642
	Heptánico	0	0

Nota: Elaborado por la autora, 2018

La Tabla 22 muestra el contenido de fenoles presentes en los extractos de *L. utilis* y *M. elliptica* en la que se observa que los extractos alcohólicos de la raíz de *L. utilis* presenta mayor concentración de fenoles con 16.323 mg/L, en comparación con los extractos de las hojas de la misma especie y de *M. elliptica*; además hay que tomar en cuenta que *M. elliptica* ocupa el segundo puesto en obtener fenoles, esto puede darse a que el extracto alcohólico de las hojas de esta planta pudo absorber otro tipo de fenoles y por lo tanto interfiere en los resultados en que presenta más contenido de fenoles que las hojas de *L. utilis*; pero aun así comparando a estas dos especies la mejor es *L. utilis*; estos resultados concuerdan con el estudio de Ricciardi et al. (2016) en el que al analizar la cantidad de fenoles totales en especies de *Asclepias* obtuvo mayor contenido en la raíz que en otras partes de las plantas, ya que indica que las raíces en general no producen clorofila y esto genera que los extractos con raíz presenten mayor contenido de metabolitos secundarios como los fenoles; igualmente en otros estudios realizados por Torres et al. (2014) se obtiene los mismos resultados en el que la raíz muestra mayor contenido de metabolitos que las hojas, además en su estudio se puede

apreciar que la presencia de fenoles como éteres metílicos en la raíz de *Hemidesmus indicus* indican que la acción de estos fenoles es de inhibir efectos del veneno de *Vipera russelli* como actividad coagulante y hemorrágica. También en el estudio de López & Pérez (2009) de “Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas” mencionan que los fenoles están presentes en mayor cantidad en las raíces de las leguminosas, es decir que se presenta similitud en los resultados con el extracto de la raíz de *L. utilis* ya que esta planta es una leguminosa y por tal razón esta es la especie con mayor contenido de fenoles.

Es así que, como lo indica Torres et al. (2014) los fenoles son de gran importancia en las plantas con actividad alexitérica ya que los metabolitos logran una interacción con los péptidos y proteínas del veneno de las serpientes haciendo que se bloqueen sitios receptores de las enzimas y posteriormente inhiben su acción, principalmente tienen efecto sobre la fosfolipasa A2; como por ejemplo los fenoles como los ácidos grasos que bloquean el canal hidrofóbico de la enzima fosfolipasa A2 logran inhibir su acción, el ácido aristolóquico que bloquea a la fosfolipasa A2 y provoca una modificación en la estructura secundaria de la proteína y como resultado va a disminuir el dolor y la inflamación y el ácido clorogénico actúa inhibiendo a la enzima lipoxigenasa logrando actividad antihepatotóxica y antiinflamatoria. En efecto, aunque los fenoles actúen directamente sobre los efectos proteolíticos, coagulantes y hemolíticos del veneno de las serpientes, estos también actúan sobre algunos de los síntomas como el dolor, hemorragia e inflamación provocando la reducción de estos sobre la víctima (Yarlequé, 2016).

Y en cuanto a los extractos heptánicos cabe recalcar que como el n-heptano es un solvente apolar (Romão, 2014), se obtuvieron absorbancias nulas para el análisis de

fenoles en los extractos secos ya que como menciona Gennaro et al.,(2003) el heptano solo extrae aceites esenciales, ya que dicho solvente tiene gran afinidad por compuestos con las mismas características.

3.3 Análisis de flavonoides totales

Se calculó los flavonoides totales realizando una curva de calibración correspondiente a quercetina (Anexo 8) y se obtuvo resultados confiables con un coeficiente de correlación de 0.9997. Los valores de las absorbancias y contenido de flavonoides se detallan mejor en el Anexo 9. En la Tabla 23 se muestra la concentración de flavonoides en las dos especies vegetales estudiadas.

Tabla 23.

Datos de la concentración en ppm de flavonoides en extractos alcohólicos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm (Barbasco) y *Mucuna cf. elliptica* (Wapaá)

Especie vegetal	Extracto	Absorbancias media (nm)	mg / L (ppm)
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	Alcohólico	0.961	7.405
	Heptánico	0	0
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	Alcohólico	3.882	14.090
	Heptánico	0	0
<i>Mucuna elliptica</i> (hojas)	Alcohólico	1.894	6.619
	Heptánico	0	0

Nota: Elaborado por la autora, 2018

La Tabla 23 muestra que el extracto alcohólico que posee más concentración de flavonoides es la raíz de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm con 14.090 mg/L y el extracto de *Mucuna cf elliptica* es el que menos contenidos presentó con 6.619 mg/L; estos resultados concuerdan con la investigación de Cueva (2017) y Reyes (2017) en la cual menciona que *L. utilis* es la que más contenido presentó; dado esto no cabe duda que

al ser comparadas las dos especies consideradas como mejores en las investigaciones anteriormente realizadas *L. utilis* es la que mayor contenido de metabolitos secundarios mostró en extractos alcohólicos siendo esta la mejor especie.

De acuerdo con el contenido de flavonoides dada la presencia de estos metabolitos en *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf. elliptica* estas plantas son consideradas anti viperinas; ya que en estudios realizados se menciona que los flavonoides también son una de las características que hace que las plantas alexitéricas pueden ser eficientes contra las mordeduras de serpientes ya que inhiben o mitigan los efectos del veneno (Castro et al., 2014). Es así que Torres et al. (2014) también afirma que los flavonoides actúan formando complejos dando como resultado la inhibición de las enzimas del veneno de las serpientes como por ejemplo flavonoides como la Rutina que inhiben la actividad de la enzima fosfolipasa A2, la Rutina está presente en raíces de *Belamcanda chinesis* ésta planta se la ha utilizado para neutralizar los efectos del veneno de *B. atrox*, presenta características inhibitorias contra el veneno de dicha serpiente, motivo por el cual las especies de *L. utilis* y *M. elliptica* que también pertenecen a la familia Fabaceae presentan flavonoides y son eficaces para neutralizar los efectos contra el veneno de *B. atrox*. Por otra parte los flavonoides actúan inhibiendo la lipoxigenasa y también inhiben la acción de las metaloproteinasas capturando metales como Zinc y Aluminio (J. Pereañez, Patiño, & Henao, 2014); es así que Baltodano (2006) indica que la presencia de flavonoides en las plantas alexitéricas van a tener la capacidad de formar complejos con el Zinc, alterando la actividad proteolítica del veneno y produciendo la inactivación de las metaloproteinasas, ya que estas dependen del Zinc para realizar su función como enzima. De idéntica manera Vásquez (2012) menciona que los flavonoides también forman complejos con el Calcio y lo que hacen es que al

contener un grupo hidroxilo estos van a formar puentes de hidrógeno con los aminoácidos del sitio activo de la fosfolipasa A2 provocando el bloqueo de su actividad enzimática, por lo tanto va a disminuir los efectos del veneno de las serpientes; sin duda alguna *L. utilis* y *M. elliptica* al poseer cierta cantidad de flavonoides sus efectos de neutralización frente al veneno de *B. atrox* se dan porque estos metabolitos han actuado sobre las enzimas del veneno formando complejos, que bloquean su acción y su función enzimática.

3.4 Actividad anticoagulante

En la Tabla 24 se observa las diferentes soluciones que se hicieron para determinar la dosis mínima de coagulación del plasma. La tabla muestra que la DMC es 0.001 µg/µL de veneno en 50 µL de solución fisiológica (PBS); en efecto la dosis mínima de coagulación del plasma es aquella en la que cierta cantidad de veneno promueve la coagulación del plasma en 60 segundos (Saravia et al., 2017). . No cabe duda que al estar el veneno en contacto con el plasma humano producirá una coagulación más rápida que la coagulación normal del plasma que tarda 180 segundos o más (Torres et al., 2014). El efecto coagulante de cantidades mínimas de veneno sobre el plasma es muy notorio ya que se observó a simple a vista que al estar en contacto veneno-plasma se produjo rápidamente la formación de coágulos; esto principalmente se debe a que el veneno de las serpientes del género *Bothrops* poseen enzimas que actúan sobre los factores de coagulación como las metaloproteinasas que lo que hacen es provocar agentes pro coagulantes en las vías intrínsecas y extrínsecas de la cascada de coagulación dando como resultado la formación de trombos en un tiempo muy corto (Patiño, López, Aristizábal, Quintana, & Benjumea, 2012).

Tabla 24.

Tiempos de coagulación del plasma humano

SOLUCIÓN	VENENO ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	TIEMPO (segundos)
1	0.02	30
2	0.013	48.8
3	0.001	60.6
4	0.0009	67
5	0.0008	67.3
6	0.0007	78.6

Nota: Elaborado por la autora, 2018

En la Tabla 25 se encuentran los diferentes tiempos de coagulación utilizando los extractos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm (Barbasco) y *Mucuna cf elliptica* (Wapaá) con veneno de *B. atrox* y con el plasma humano. Se observó que el extracto alcohólico de la raíz de *L. utilis* es el tratamiento que mejores resultados presentó en cuanto a prolongar el tiempo de coagulación del plasma sanguíneo. La tabla muestra los tiempos de coagulación en segundos de los tratamientos (extracto vegetal + plasma + veneno).

Tabla 25.

Tiempo de coagulación de los extractos alcohólicos y heptánicos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm (Barbasco) y *Mucuna cf elliptica* (Wapaá) en plasma sanguíneo con veneno de *B. atrox*

EXTRACTO ALCOHÓLICO	ESPECIE VEGETAL	TIEMPO (segundos)
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	196
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	203
	<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	112
EXTRACTO HEPTÁNICO	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	158
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	170
	<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	94

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Además la Tabla 25 muestra que los mejores tiempos de prolongación de la coagulación del plasma son los extractos alcohólicos más que los heptánicos. Es así que la raíz de *Lonchocarpus utilis* prolongó el inicio de la coagulación en 203 segundos y la que menor tiempo lo prolongó fue las hojas de *Mucuna elliptica* con 94 segundos; es decir, que ambas especies lograron aumentar el tiempo de coagulación sanguíneo confirmando así la actividad alexítera de las especies vegetales estudiadas. Los resultados obtenidos concuerdan con estudios ya realizados sobre veneno de *B. atrox* en que los extractos que poseen actividad alexítera son los que prolongaron el tiempo de coagulación del plasma (Duque, Fernández, Vargas, López, & Scannone, 2014). Torres et al. (2014) menciona que la neutralización del efecto coagulante del veneno se da cuando el tiempo de coagulación no esté tan cercano a la dosis mínima de coagulación y se considera que los extractos tienen mayor capacidad neutralizante ya que en el estudio de Ricciardi et al. (2016) menciona que el efecto anticoagulante de los extractos impiden la acción de las enzimas presentes en el veneno del género

Bothrops, es decir, que la prolongación del tiempo de coagulación ocurre porque al haber una interacción entre los componentes del extracto con las enzimas del veneno; estos componentes inhiben la acción de las metaloproteasas tipo serina haciendo que estas no puedan transformar el fibrinógeno en fibrina y por lo tanto van a impedir que se formen trombos rápidamente.

3.4.1 Análisis estadístico de la actividad anticoagulante

Se realizó un análisis de varianza ANOVA en el que se observa que para el tipo de extracto y la interacción de extracto-especie no existe diferencia significativa como tal ya que sus valores son mayores al p-valor (nivel de significancia) (Tabla 26).

Tabla 26.

ANOVA de los tiempos de coagulación

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	29391.78	5	5878.36	4.20	0.0195
Extracto	80.22	1	80.22	0.06	0.8149
Especie	25139.11	2	12569.56	9.25	0.0041
Extracto* Especie	4172.44	2	2086.22	1.49	0.2645
Error	16813.33	12	1401.11		
Total	46205.11	17			
F.V: Fuente de variación, SC: suma de cuadrados; gl: grados libertad, CM: cuadrados medios, F: valor f, p-valor: valor p					

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Este análisis estadístico quiere decir que al evaluar por separado a los extractos quiere decir que; tanto el extracto alcohólico como el heptánico no resultan influir mucho en la eficiencia del efecto de anticoagulación, ya que cada tipo de extracto que se utilizó ya sea alcohólico o heptánico no representan diferencia significativa, es decir que ambos extractos tanto el alcohólico como el heptánico ayudan a reflejar resultados

satisfactorios en cuanto a prolongar el tiempo de coagulación. Pero al contrario analizando el tipo de especie vegetal se demuestra que si existe diferencia significativa al comparar los valores con un nivel de significancia de 0.05 como se puede visualizar en la Tabla 26 por lo que los resultados se expresan de tal manera que los valores al ser menores a $p < 0.05$ quiere decir que es significativo, por ende los resultados al ser menores al p -valor muestran que existe una variable que es mejor que otra (J. D. Martínez, Riojas, & Rendón, 2017), por lo tanto, esto quiere decir que una de las dos especies es mejor que la otra independientemente del tipo de extracto utilizado. Por otra parte en la interacción de ambos, el extracto y la especie tampoco muestran diferencia significativa ya que al encontrarse interactuando extracto + especie refleja que las modificaciones en los tiempos de coagulación se dio porque una de las especies vegetales es mejor que la otra independientemente del extracto alcohólico o heptánico utilizado ya que ambos son totalmente eficientes en esta prueba según los resultados antes mencionados, pero cabe recalcar que aunque no exista diferencia significativa para extracto alcohólico y heptánico por lo menos una de las dos especies va influir en que uno de los dos extractos sea mejor que el otro.

Tabla 27.

Análisis post hoc (Tukey) para especie vegetal de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm (Barbasco) y *Mucuna cf elliptica* (Wapaá)

Especie	Medias	Rango	
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	186.33	A	
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	176.67	A	
<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	102.67		B

Nota: Elaborado por la autora, 2018

La Tabla 27 muestra que la raíz de *Lonchocarpus utilis* posee más actividad anticoagulante que las hojas de la misma especie y las hojas de *Mucuna elliptica*; Por otro lado, si se compara la especie con mayor actividad anticoagulante es claro que *L. utilis* presentó superioridad sobre *M. elliptica* al encontrarse en un rango superior; estos datos se corroboran con los tiempos de coagulación ya realizados.

Es así que al existir diferencia significativa entre *Lonchocarpus utilis* y *Mucuna elliptica*, una de estas especies sobresale en la actividad neutralizante sobre la coagulación del plasma humano y por lo tanto posee mejores características en cuanto a inactivar o desactivar enzimas responsables de la coagulación (Torres de Sosa, Camargo, Avanza de Temporetti, Tressens, & Ricciardi, 2004). Por este motivo se realizó el análisis de Tukey a un nivel de significancia de 0.05 para identificar la especie vegetal con mayor capacidad de prolongar el tiempo de coagulación en plasma sanguíneo (Tabla 27).

Por lo tanto el análisis Tukey consiste en determinar la diferencia mínima significativa, es decir, que al haber una significancia en una variable es necesario realizar pruebas post Hoc como la de Tukey para poder comparar las medias y decidir cuál es mejor que la otra, además esta prueba nos da una distribución de las medias por rangos para la variable analizada (Padilla, 2013); es por ese motivo que al comparar estas dos especies nos muestra que rangos similares son compartidos por *L. utilis* tanto en raíz como en hojas dando a conocer que como se mencionó antes los órganos de la planta al pertenecer a la misma especie no sugieren alguna diferencia ya que ambas poseen las mismas propiedades frente a la actividad coagulante del veneno y por ende estas son mejores que la especie *M. elliptica* ya que no comparten el mismo rango con *L. utilis* demostrando que esta especie tiene efecto de anticoagulación mucho mayor a la otra.

Tabla 28.

Análisis post hoc (Tukey) para tipo de extracto en *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf elliptica*

Extracto	Medias	Rango
Alcohólico	157.33	A
Heptánico	153.11	A

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Además en la Tabla 28 se puede observar un análisis Tukey que se realizó para demostrar el extracto con mayor prolongación del tiempo de coagulación. Aunque en el ANOVA no existe diferencia significativa entre ambos extractos, los valores de las medias en la prueba de Tukey nos muestran que el extracto alcohólico tiene mayor capacidad anticoagulante sobre el heptánico. En efecto con los resultados obtenidos tenemos que el extracto alcohólico de *L. utilis* tiene la capacidad de prolongar más el tiempo de coagulación del plasma humano que *M. elliptica*.

Teniendo en cuenta que el veneno de *B. atrox* contiene un conjunto de enzimas especialmente serinoproteasas que afectan a la coagulación del plasma acelerando la formación de trombos, los efectos de los extractos al parecer poseen componentes que reaccionan con las enzimas del veneno y hacen que se produzca un efecto deseable para aumentar el tiempo de coagulación del plasma humano (Gómez, 2015); los extractos alcohólicos de *L. utilis* tienden a dar los mejores resultados que los extractos heptánicos ya que se debe a que esta especie posee mayor concentración de fenoles y flavonoides extraídos por este solvente en comparación con *M. elliptica*.

Tabla 29.

Análisis post hoc (Tukey) para interacción especie con extracto de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf elliptica*

Extracto	Especie	Medias	Rango	
Alcohólico	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	202.67	A	
Heptánico	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	195.67	A	B
Heptánico	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	170	A	B
Alcohólico	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	157.67	A	B
Alcohólico	<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	111.67	A	B
Heptánico	<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	93.67		B

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Ahora bien con la Tabla 29 se observa que con el análisis Tukey realizado para la interacción entre extracto-especie el mejor tratamiento es el extracto alcohólico + raíz de *L. utilis* ya que estos resultados afirman que esta interacción resultó ser la mejor en la actividad anticoagulante frente al veneno de *B. atrox* ya que desde un principio se observó que este tratamiento prolongó más el tiempo de coagulación del plasma sanguíneo comparándola con la dosis mínima de coagulación; además también se afirma que la interacción menos eficiente para inhibir el efecto de coagulación es el tratamiento del extracto heptánico + hojas de *M. elliptica* ya que como se observó antes en los resultados del tiempo de coagulación esta interacción representa la menor prolongación de formación de coágulos frente a la dosis mínima de coagulación. Además cabe recalcar que aquellas interacciones que tengan diferente rango, es decir, que no son significativamente diferentes ya que comparten la misma letra, que en este caso es A y B; por lo tanto es notable que las interacciones de *L. utilis* son mejores que *M. elliptica* tanto en extractos heptánicos como en alcohólicos ya que esta especie

vegetal demostró los mejores resultados para esta prueba *in vitro* aunque no ha existido diferencia significativa tan relevante ya que ambas especies cumplen con el hecho de que prolongan más el tiempo de coagulación, pero como en toda prueba estadística una sobresale mejor que otra.

Con estos resultados que reflejan las interacciones del extracto-especie más las variaciones en los tiempos de coagulación del plasma se puede decir que es indudable decir que la actividad anticoagulante de la raíz de *L. utilis* principalmente es la más eficiente ya que refleja los mejores resultados y además cabe mencionar que al realizar las prueba *in vitro* demuestra que los componentes de la raíz de esta planta contribuye a modificar las serino proteinasas presentes en el veneno de *B. atrox* haciendo que se bloqueen y no puedan continuar con su actividad en la cascada de coagulación, además Torres de Sosa et al. (2004) afirman que gracias a la interacción de extractos alcohólicos con una especie alexitéra al modificar los tiempos de coagulación debe ser efecto de la cantidad de componentes presentes en dicha especie y a esta propiedad se la atribuye los fenoles ya que además de poseer propiedades antiinflamatorias contribuyen a reaccionar con las enzimas del veneno dando como resultado un efecto positivo en la coagulación del plasma.

3.5 Actividad anti hemolítica

La Tabla 30 muestra los valores de las absorbancias de los extractos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf. elliptica* y su respectivo porcentaje de hemólisis.

Tabla 30.

Actividad anti hemolítica de los extractos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf elliptica*

Soluciones	Absorbancias (nm)	(%) Hemólisis
(hojas) <i>Lonchocarpus utilis</i> n-heptánico + eritrocitos + yema de huevo + PBS + veneno	2.9265	32.13
(raíz) <i>Lonchocarpus utilis</i> n-heptánico + eritrocitos + yema de huevo + PBS + veneno	2.1385	96.55
(hojas) <i>Mucuna elliptica</i> n-heptánico + eritrocitos + yema de huevo + PBS + veneno	1.3651	61.64
(hojas) <i>Lonchocarpus utilis</i> alcohólico + eritrocitos + yema de huevo + PBS + veneno	0.4340	19.60
(raíz) <i>Lonchocarpus utilis</i> alcohólico + eritrocitos + yema de huevo + PBS + veneno	1.2256	55.34
(hojas) <i>Mucuna elliptica</i> alcohólico + eritrocitos + yema de huevo + PBS + veneno	0.6264	28.28
Eritrocitos + PBS + veneno + yema de huevo		100
Eritrocitos + PBS + yema de huevo		32.27

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Los porcentajes de hemólisis se tomaron como el 100 % de hemoglobina liberada haciendo referencia al blanco positivo (eritrocitos + PBS + veneno + yema de huevo), esto quiere decir que cualquier tratamiento que presente un valor menor al 100 % de hemólisis mayor va hacer la capacidad de inhibición del efecto hemolítico del veneno de *B. atrox*. En la tabla se observa que el extracto alcohólico de las hojas de *L. utilis* posee un efecto anti hemolítico mayor al de los otros extractos con 19.60 % y como resultado se dice que con este tratamiento se reduce la hemólisis logrando que se consiga un efecto inhibitorio de la hemólisis sobre el veneno de *B. atrox*. Además se puede observar que los valores del extracto heptánico no son eficientes contra la hemólisis causada por el veneno ya que sus porcentajes son más altos que los

alcohólicos. Por consiguiente después del extracto de hojas de *L. utilis* alcohólico como mejor neutralizando este efecto, la segunda mejor especie es hojas de *M. elliptica* alcohólico ya que muestra un porcentaje de 28.28 % lo que quiere decir que aplicando esta solución puede disminuir la hemólisis en un buen porcentaje. Los resultados de la actividad anti hemolítica se detallan en el Anexo 14 y Anexo 15.

En los estudios realizados por Cueva (2017) y Reyes (2017) muestran que tanto los extractos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf. elliptica* tienen la capacidad de inhibir la actividad hemolítica del veneno de *B. atrox* debido a la presencia de fenoles y flavonoides presentes en los extractos alcohólicos que de la misma forma se observó en esta investigación y además los resultados obtenidos demuestran que el extracto alcohólico de *L. utilis* es más eficiente que el extracto alcohólico de la especie *M. elliptica* ya que presentó mayor actividad anti hemolítica.

La variación de los porcentajes del efecto anti hemolítico puede ocurrir por el tipo de hábitat de la planta, parte de la planta utilizada, su lugar de procedencia, las condiciones de suelo, etc (Barranco, 2010). De esta manera se explicaría las diferencias encontradas en el porcentaje de hemólisis entre la raíz y hojas de *L. utilis*. Por ende se puede decir que para este caso las hojas de *L. utilis* son más eficientes que la raíz en inhibir la actividad anti hemolítica del veneno de *B. atrox*. Es claro que tanto el extracto alcohólico como heptánico de ambas plantas influyen sobre el efecto hemolítico del veneno de *B. atrox* Ortiz et al. (2012) indica que el efecto hemolítico del veneno de *B. atrox* ocurre por la enzima fosfolipasa A2 y al estar en contacto con extractos de plantas alexíteras su acción disminuye y por lo tanto dicho efecto va a disminuir. Además Patiño et al. (2012) demuestran que el efecto anti hemolítico contra el veneno de *B. asper* ocurre por la presencia de compuestos fenólicos que actúan sobre

la proteínas del veneno haciendo que estas precipiten; además estos compuestos pueden formar complejos con algunos metales como por ejemplo el Ca^{2+} , indispensable para que la fosfolipasa A2 realice catálisis y como resultado se inhibiría la actividad de la enzima.

3.6 Actividad anti proteolítica

Los resultados de la actividad anti proteolítica se detallan en el Anexo 16y Anexo 17

Tabla 31.

Actividad proteolítica expresada en U/mg de los extractos heptánicos y alcohólicos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf elliptica*

Extracto	Especie	Absorbancia (nm)	Unidades/mg
Alcohólico	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	0.1647	87.73
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	0.3146	237.70
	<i>Mucuna elliptica</i> (hojas)	1.3651	125.17
Heptánico	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	0.3723	295.33
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	0.5664	489.50
	<i>Mucuna elliptica</i> (hojas)	0.1313	54.37
Blanco: 0.0769 nm Blanco positivo: (ATA+VENENO+CASEINA)			

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Se muestra la actividad anti proteolítica de los extractos heptánicos y alcohólicos de las especies vegetales *Lonchocarpus utilis* y *Mucuna elliptica* expresadas en U/mg (unidades de proteólisis/mg); la cual se obtuvo por medio de la Ecuación 4. Lo que se evidencia es que los que poseen las cantidades más bajas de Unidades de proteólisis/mg son aquellas que poseen mayor actividad de proteólisis como se muestra

en la Tabla 31. El valor más bajo de U/mg corresponde al extracto heptánico de las hojas de *M. elliptica* con 54.37 U/mg y para los extractos alcohólicos es de 87.73 U/mg que corresponde a las hojas de *L. utilis*, es decir que las hojas de *M. elliptica* resulto ser la mejor en inhibir el efecto proteolítico del veneno de *B. atrox*, es así que según León (2017) los extractos que presenten mayor actividad de inhibición de la proteólisis del veneno de *B. atrox* son aquellos que muestran bajos valores de U/mg, por ende las hojas de *M. elliptica* y *L. utilis* para este caso representan un buen resultado y por esta razón estas especies lograron modificar el perfil proteico en la electroforesis ya que los extractos heptánicos fueron los que presentaron la aparición de bandas en la electroforesis. El extracto con menos inhibición del efecto proteolítico del veneno de *B. atrox* es el extracto heptánico de la raíz de *L. utilis* con 489.50 U/mg ya que representa el mayor valor dentro de la tabla. En el estudio de Pereañez et al. (2008) muestra que los efectos anti proteolíticos sobre el veneno de *B. asper* ocurre porque los extractos de las plantas tuvieron acción frente a la caseína empleada como proteína para analizar el efecto proteolítico del veneno de la serpiente, es así que comparando los resultados de esta investigación con dicho estudio mencionado ya que se realizó con una metodología similar cabe recalcar que los extractos de las plantas de *L. utilis* y *M. elliptica* tuvieron acción sobre la caseína provocando la degradación de la misma y como resultado es que estos dos extractos indican tener inhibición sobre el efecto proteolítico para el veneno de *B. atrox*. Además al igual que el efecto hemolítico como lo dice Patiño et al. (2012) la actividad de los extractos se debe a que por la presencia de metabolitos secundarios y de otros componentes de las plantas como los taninos, en cuanto a los metabolitos secundarios como fenoles y flavonoides estos van a formar complejos con metales como el Zn^{2+} haciendo que proteínas como las metaloproteasas no puedan captar el Zn^{2+} y no puedan realizar su función proteolítica,

debido a que estas proteínas son dependientes de Zn^{2+} por lo tanto al no captar este metal su función va a ver que se disminuya el efecto proteolítico del veneno causado por los componentes de los extractos de *L. utilis* y *M. elliptica*; y por otra parte en lo que se refiere con taninos estos igualmente que los fenoles y flavonoides van a formar complejos con las proteínas de los venenos haciendo que se bloqueen las enzimas y como resultado no puedan realizar su acción proteolítica (Vásquez, 2012), y es por tal motivo que debido a que existe una sinergia entre metabolitos secundarios y taninos da como resultado que los extractos de las plantas que en este caso es *M. elliptica* tenga mayor actividad anti proteolítica frente al veneno de *B. atrox*, ya que debe ser que *M. elliptica* al contener una cantidad considerable de fenoles y flavonoides al ocurrirse una sinergia con los taninos le dan una potencialidad de neutralización a las proteínas del veneno de *B. atrox*.

Además Pereañez et al. (2008) menciona que los mecanismos de acción frente a la actividad anti proteolítica de los extractos en su estudio “Inhibition of proteolytic, coagulant and indirect hemolytic activities induced by *Bothrops asper* venom, by ethanolic extracts from three heliconias species” puede darse por la manera en cómo actúan con las proteínas del veneno; y por ese motivo es que los extractos de *L. utilis* y *M. elliptica* pueden actuar de diferente manera a las proteínas del veneno de *B. atrox*.

3.6.1 Análisis estadístico de la actividad anti proteolítica

Tabla 32.

ANOVA de la actividad anti proteolítica para los extractos heptánicos y alcohólicos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf elliptica*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	101799.03	3	33933.01	2.22	0.3257
Especie	25168.33	1	25168.33	1.65	0.3281
Tratamiento	76630.7	2	38315.35	2.51	0.2853
Error	30588.49	2	15294.25		
Total	132387.52	5			
F.V: Fuente de variación, SC: suma de cuadrados; gl: grados libertad, CM: cuadrados medios, F: valor f, p-valor: valor p					

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Como se observa en la Tabla 32 se indica que no existe diferencia significativa ya que los valores son mayores a un nivel de significancia de 0.05 ($p > 0.05$) tanto para el extracto (alcohólico o heptánico) y para el tratamiento (especie vegetal + caseína + veneno); por lo tanto si los valores fueran menores al nivel de significancia de 0.05 se podría decir que serían significativamente diferentes tal como lo menciona Martínez et al. (2017).

3.7 Perfil proteico en electroforesis SDS-page

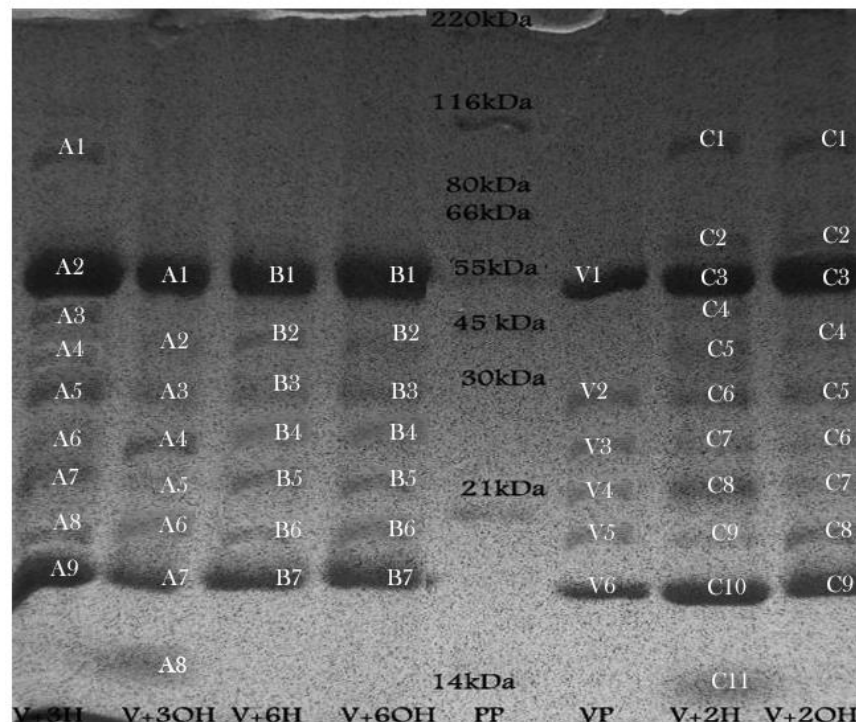
A continuación se presenta en la Figura 10 el recorrido de las bandas en el gel de poliacrilamida con los respectivos pesos moleculares de la proteína patrón. Debido a esto en el perfil proteico de la electroforesis se muestran cambios en las bandas observándose la presencia, la desaparición y el movimiento en otra parte del gel ya que como lo menciona Camargo & Torres (2011) significa que al haber dichos cambios las plantas presentan actividad neutralizante; además Olmedo & López (2012) señalan que la movilidad electroforética está en función del tamaño y de la

carga por unidad de masa, es decir, cuanto menor sea la masa molecular de la proteína, mayor será la movilidad de la misma y viceversa .

Cabe destacar que los resultados muestran que ambos extractos poseen actividad pero los extractos heptánicos son los que presentan mayor actividad ya que se han eliminado y aparecido nuevas bandas; relacionando dichos resultados con el estudio de Torres et al. (2014) “Plantas como antiveneno: del mito al logos” menciona que aquellos extractos que poseen actividad son los que modifican las bandas en alguna parte del gel de electroforesis analizando el perfil proteico del veneno de la serpiente. Además en la investigación de León (2017) demuestra que los extractos que más actividad poseen son los que han modificado el perfil proteico del veneno dando así a afirmar que los extractos se pueden considerar alexíteros por dicha acción.

De esta forma es muy útil saber que los extractos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf elliptica* actúan de forma diferente por lo que produjeron dichos cambios en las proteínas dando como resultado el aparecimiento de bandas en el perfil electroforético; ya que según Camargo et al. (2011) para que se de dicha modificación se debe a que los extractos influyen mucho en cómo actúan los componentes de las plantas con las proteínas del veneno de la serpiente, así pues la interacción entre veneno-extracto de las plantas logran demostrar diferencias en el perfil proteico inicial, entonces se puede decir que los extractos de *L. utilis* y *M. elliptica* utilizados en esta investigación poseen actividad de inhibición sobre los efectos del veneno de *B. atrox*.

Recorrido de las bandas proteicas de los extractos de *Lonchocarpus utilis* y *Mucuna elliptica*



V+3H: veneno + extracto heptánico hojas de *Lonchocarpus utilis*; V+3OH: veneno + extracto alcohólico hojas de *Lonchocarpus utilis*; V+6H: veneno + extracto heptánico de *Mucuna elliptica*; V+6OH: veneno + extracto alcohólico de *Mucuna elliptica*; V+2H: veneno + extracto heptánico raíz *Lonchocarpus utilis*; V+2OH: veneno + extracto alcohólico raíz *Lonchocarpus utilis*; PP: proteína patrón; VP: veneno patrón

A: hojas de *L.utilis*
 B: hojas de *M.elliptica*
 C: raíz de *L.utilis*
 V: veneno patrón

Figura 10. Perfil electroforético de las bandas de las especies vegetales de *L. utilis* y *M.elliptica* frente a una proteína y veneno patrón.

Nota: Elaborado por la autora, 2018.

3.7.1 Determinación del peso molecular de las bandas

Para determinar el peso de las proteínas de cada uno de los extractos y del veneno de *B. atrox*, en primer lugar se calculó la movilidad electroforética relativa (RF) de la proteína patrón según la Ecuación 6; después se construyó una curva estándar con los RF versus el logaritmo del peso molecular perteneciente a la proteína patrón tal como

se muestra en la Tabla 33 para obtener una ecuación lineal (Ecuación 7) presente en el Anexo 19 con la cual se determinó el logaritmo del peso molecular de las muestras hallando primero el RF de cada una, y además se interpretó los pesos moleculares de cada banda con el antilogaritmo respectivamente (Mendoza et al., 2009).

Ecuación 6. Ecuación del RF

$$RF = \frac{\text{distancia que migra una determinada proteina}}{\text{distancia que migra frente al gel}}$$

Nota: Tomado de Maldonado & Jorrín (2001)

Tabla 33.

Peso molecular de la proteína patrón y su recorrido por el gel de electroforesis

DT	PP	RF	PM	log PM kDA
14.8	0.5	0.03	220	2.3
	2.2	0.15	116	2.1
	3.6	0.24	80	1.9
	4.2	0.28	66	1.8
	5.6	0.38	55	1.7
	6.5	0.44	45	1.7
	7.5	0.51	30	1.5
	10.2	0.69	21	1.3
	14	0.95	14	1.1
DT: distancia total recorrida (cm) PP: proteína patrón RF: distancia o recorrido de las bandas PM: peso molecular (kDA)				

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Además en esta tabla muestra los RF encontrados de la proteína patrón y el logaritmo del peso molecular que ayudó a construir la curva estándar para poder encontrar los diferentes pesos moleculares de cada banda proteica, además se midió el recorrido total del gel en centímetros para tener una referencia de la movilidad de todas las bandas proteicas y como se mencionó antes se halló el peso molecular con el antilogaritmo y

los RF correspondientes a los extractos alcohólicos y heptánicos de *L. utilis* y *M. elliptica*.

Ecuación 7. Ecuación de la curva de regresión lineal

$$y = -1.2891x + 2.2442$$

Siendo:

Y= log Peso Molecular; m= pendiente (-1.2891); x= RF encontrado;
b= ordenada al origen (2.2442)

Tabla 34.

Número de bandas de cada una de las muestras depositadas en el gel de electroforesis

Muestras	Numero de bandas
<i>Lonchocarpus utilis</i> raíz (2H)	11
<i>Lonchocarpus utilis</i> raíz (2OH)	9
<i>Lonchocarpus utilis</i> hojas (3H)	9
<i>Lonchocarpus utilis</i> hojas (3OH)	8
<i>Mucuna elliptica</i> hojas (6H)	7
<i>Mucuna elliptica</i> hojas (6OH)	7
VP	6
PP	9
H: heptánico; OH: alcohol; VP: veneno patrón; PP: proteína patrón	

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Según los números de bandas comparadas con las del veneno de *B. atrox* podemos observar que existe una gran diferencia en la raíz de *L. utilis* heptánico y alcohólico ya que estas dos muestras poseen mayor número de bandas que el veneno patrón, esto se debe a que existe la aparición de nuevas bandas en el perfil proteico; también en las hojas de *L. utilis* heptánico se observan más bandas y en los extractos de las hojas de *M. elliptica* también existe una pequeña diferencia del número de bandas tal como se

muestra en la Tabla 34, por esta razón se determinó el peso molecular de las bandas de *L. utilis* y *M. elliptica* especialmente de aquellas que se encuentran en otras posiciones como se muestra en la Figura 10.

Tabla 35.

Peso molecular de las proteínas del veneno de *B. atrox* en kDa

Distancia VP (cm)	RF	Y (log PM)	PM (antilog Y) kDA
6	0.41	1.72	52.7
8.1	0.55	1.54	34.6
9.2	0.62	1.44	27.7
10.1	0.68	1.36	23.1
11	0.74	1.29	19.3
12.1	0.82	1.19	15.5
DT= 14.8 cm			
DT: distancia total del gel; VP: veneno patrón; RF: recorrido de la banda; PM: peso molecular (kDA)			

Nota: Elaborado por la autora, 2018

En la Tabla 35 se observa que el veneno patrón mostró en el gel de electroforesis un total de 6 bandas y cada una de ellas se encuentra con su respectivo peso molecular en kDa. En un estudio de patrones electroforéticos de los venenos de serpientes del género *Bothrops* de Mendoza et al. (2009) se presentaron resultados similares en la aparición de bandas del veneno de *B. atrox* ya que la mayoría de bandas se ubicaron entre los 55 kDa a los 15 kDa bajo condiciones desnaturalizantes, en cuanto al número de bandas del veneno de *B. atrox* se puede decir que es variable ya que depende mucho del estado de la serpiente como su alimentación, estado fisiológico, hábitat, entre otros (Rojas, Ramírez, Cobos, Castro, & Castro, 2011) y por lo tanto su contenido proteico va variar. Además el recorrido de las bandas a través del gel se da porque al haberse realizado una electroforesis en gel de poliacrilamida en agentes

desnaturalizantes lo que hace es que las proteínas se van a desnaturalizar debido a la utilización de agentes desnaturalizantes (Maldonado & Jorrín, 2001), esto quiere decir que las proteínas al estar en contacto con los agentes desnaturalizantes van a perder su estructura secundaria y además se van a desintegrar sus subunidades y es por tal motivo que se da la migración de las bandas ya que las proteínas al estar cargadas negativamente estas van a migrar hacia el polo positivo durante este proceso.

Tabla 36.

Peso molecular de las proteínas del extracto heptánico y alcohólico de hojas de *Lonchocarpus utilis*

3H (<i>Lonchocarpus utilis</i> hojas)			
Distancia de la banda (cm)	RF	Y (log PM)	PM kDA (antilog Y)
2.9	0.20	1.99	98.1
5.9	0.40	1.73	53.7
6.2	0.42	1.70	50.6
7.2	0.49	1.62	41.4
8.1	0.55	1.54	34.6
9.2	0.61	1.45	27.7
10.1	0.68	1.36	23.1
11	0.74	1.29	19.3
12.1	0.82	1.19	15.5
3OH (<i>Lonchocarpus utilis</i> hojas)			
5.9	0.40	1.73	53.7
6.9	0.47	1.64	44.0
8.1	0.55	1.54	34.6
8.9	0.60	1.47	29.4
9.7	0.66	1.40	25.1
11	0.74	1.29	19.3
12	0.81	1.20	15.8
13.7	0.93	1.05	11.2
RF: recorrido de la banda; PM: peso molecular; H: heptánico; OH: alcohólico			

Nota: Elaborado por la autora, 2018

En la Tabla 36 se observa que los pesos moleculares que se encuentran resaltados son aquellos en los que ha existido una modificación de las bandas proteicas ya que las muestras dieron el aparecimiento de nuevas bandas entre estas están los pesos de 98.1 kDA, 50.6 kDA y 41.4 kDA para el extracto heptánico de las hojas de *L. utilis*; en cambio en el extracto alcohólico de las hojas de *L. utilis* el peso de 44 kDA corresponde al aparecimiento de una nueva banda. Cabe destacar que tanto para el extracto alcohólico y heptánico existe un aumento de bandas al comparar con el veneno patrón y además se puede apreciar que el extracto heptánico es el que posee más número de bandas con respecto al veneno patrón. Tanto el extracto heptánico como el alcohólico de las hojas de *L. utilis* muestran el aparecimiento de bandas; Fernández, Ortiz, Pereañez & Martínez (2010) mencionan que esto se puede dar porque al interaccionar los extractos con el veneno los componentes de las especies vegetales utilizadas en esta investigación pueden provocar cambios sobre las proteínas del veneno de *B. atrox* haciendo que de tal manera puedan contrarrestar los efectos de esta serpiente. Los resultados que se muestran de los pesos moleculares de los extractos de las hojas de *L. utilis* están entre los 23 kDA y 50 kDA lo que Ortiz et al. (2012) menciona que si las bandas se encuentran dentro de este rango las proteínas pertenecen a las metaloproteasas tipo I y III. También el aparecimiento de una banda dentro del rango de 95 kDA y 110 kDA es similar al estudio realizado por Barranco (2010) en el cual hace referencia que si existen bandas dentro de este rango es posible que los extractos puedan tener efectos anti hemolíticos.

Tabla 37.

Peso molecular de las proteínas del extracto heptánico y alcohólico de hojas de *Mucuna elliptica*

6H (<i>Mucuna elliptica</i> hojas)			
Distancia de la banda cm	RF	Y (log PM)	PM kDA (antilog Y)
6	0.41	1.72	52.7
7	0.47	1.63	43.1
8.1	0.55	1.54	34.6
9.1	0.61	1.46	27.9
9.9	0.67	1.38	24.1
11	0.74	1.29	19.3
12.1	0.82	1.19	15.5
6OH (<i>Mucuna elliptica</i> hojas)			
6	0.41	1.72	52.7
7.2	0.49	1.62	41.4
8.1	0.55	1.54	34.6
9.1	0.61	1.45	28.3
9.9	0.66	1.39	24.1
10.7	0.72	1.31	20.5
12	0.81	1.20	15.8
RF: recorrido de la banda; PM: peso molecular; H: heptánico; OH: alcohólico			

Nota: Elaborado por la autora, 2018

La Tabla 37 muestra que en el extracto heptánico y el extracto alcohólico de las hojas de *M. elliptica* se observan nuevas bandas con pesos de 43.1 kDA y 41.4 kDA respectivamente. Como se encontraron bandas entre el rango de 55 kDA y 45 kDA los resultados evidencian que estas proteínas de peso molecular entre este rango tienen la posibilidad de actuar sobre el efecto proteolítico del veneno de *B. atrox* (Ortiz et al., 2012). Con respecto a las otras bandas estas se encuentran en el mismo sitio que las bandas del veneno patrón pero si existe el movimiento de algunas pero de tan solo algunos centímetros, esto quiere decir que no se modifica mucho los pesos moleculares ya que solo se han movido unos pocos milímetros con respecto a la movilidad de las bandas del veneno patrón; este movimiento de algunas bandas se da sobre los 30 kDA

que al parecer si se encuentran desde este rango las proteínas son toxinas, según Mendoza et al. (2009) las toxinas del veneno están presentes pero al haber una modificación se confirma que tanto en la proteólisis y hemólisis los extractos de *L. utilis* y *M. elliptica* son plantas que inhiben dichos efectos; además esto no influye mucho como las bandas nuevas que aparecieron con estos extractos al estar en contacto con el veneno de *B. atrox*. Hay que recalcar que ambos extractos de las hojas de *M. elliptica* han tenido la misma actividad, es decir que con ambos extractos se obtuvo una banda que no aparece dentro de los rangos de 55 kDA y 30 kDA del veneno patrón.

Tabla 38.

Peso molecular de las proteínas del extracto heptánico y alcohólico de la raíz de *Lonchocarpus utilis*

2H (<i>Lonchocarpus utilis</i> raíz)			
Distancia de la banda cm	RF	Y (log PM)	PM kDA (antilog Y)
3	0.20	1.98	96.1
5.1	0.34	1.80	63.1
6	0.41	1.72	52.7
6.4	0.43	1.69	48.6
7.4	0.50	1.60	39.8
8.2	0.55	1.53	33.9
9.2	0.62	1.44	27.7
10.1	0.68	1.36	23.1
11.1	0.75	1.28	18.9
12.1	0.82	1.19	15.5
14.2	0.96	1.01	10.2
2OH (<i>Lonchocarpus utilis</i> raíz)			
3.1	0.21	1.97	94.2
5	0.34	1.81	64.4
6.1	0.41	1.71	51.6
7	0.47	1.63	43.1
8.1	0.55	1.54	34.6
9.1	0.61	1.45	28.3
10	0.68	1.37	23.6
11	0.74	1.29	19.3
12.1	0.82	1.19	15.5
RF: recorrido de la banda; PM: peso molecular; H: heptánico; OH: alcohólico			

Nota: Elaborado por la autora, 2018

En la Tabla 38 el extracto de *Lonchocarpus utilis* demuestra que existe el apareamiento de una banda por debajo de los 14 kDA y esto está relacionado con el peso molecular de la fosfolipasa A2, por lo tanto esta banda interacciona con esta enzima reduciendo su actividad Zambelli, Picolo, Fernandes, Fontes, & Cury (2017). Además se puede observar que el extracto heptánico de la raíz de *L. utilis* posee más actividad, esto quiere decir que es el extracto con más bandas que aparece dentro del perfil proteico comparándolo con el veneno patrón, por lo tanto este extracto puede

estar interactuando de manera diferente al estar en contacto con el veneno de *B. atrox*; además el extracto heptánico presenta la aparición de nuevas bandas cuyos pesos moleculares son de 96.1 kDA, 63.1 kDA, 48.6 kDA, 39.8 kDA y 10.2 kDA. Al contrario con el extracto alcohólico este presenta bandas con pesos de 94.2 kDA, 64.4 kDA y 43.1 kDA respectivamente.

Además es necesario tomar en cuenta que en el extracto alcohólico de las hojas de *L. utilis* y el extracto de las hojas de *M. elliptica* comparten el apareamiento de una nueva banda. De todos modos los extractos de *Lonchocarpus utilis* y *Mucuna elliptica* actúan diferente sobre el veneno de *B. atrox* en cada uno de los ensayos *in vitro* realizados ya que en la raíz de *L. utilis* se presenta mucha más actividad neutralizante que las hojas aunque pertenezcan a la misma planta y por lo tanto si existe alguna diferencia entre las partes de la planta utilizadas en esta investigación y además esta especie vegetal es más eficaz que *M. elliptica* en neutralizar las actividades del veneno de pitalala como ya se observó en los ensayos *in vitro* realizados. En base a los resultados obtenidos en la modificación del perfil proteico en la interacción del veneno con el extracto, se observó que existen cambios en el gel, de la misma manera que sucedió en la investigación de Ricciardi et al. (2016) el cual recalca que por los cambios que obtuvo en la electroforesis SDS page con los extractos de las especies de *Asclepias* que utilizó en su ensayo logró determinar que por tal razón sus extractos si actúan en contra del veneno de la serpiente del género *Bothrops*.

Conclusiones

El extracto de la raíz de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm (Barbasco) alcohólico es la especie con mejores rendimientos ya que presentó 7.20 % de rendimiento en comparación con los extractos alcohólicos y heptánicos de las hojas de *L. utilis* y *M. elliptica*; ya que los órganos de las plantas influyen durante la extracción.

En cuanto al contenido de flavonoides y fenoles totales la raíz de *Lonchocarpus utilis* en extracto alcohólico representa mayor contenido que las hojas de *M. elliptica* y las hojas de *L. utilis*; por lo tanto la presencia de estos metabolitos secundarios con la interacción de otros compuestos les da la función de plantas alexíteras.

En la coagulación del plasma sanguíneo el extracto alcohólico de la raíz de *Lonchocarpus utilis* es mejor que los extractos alcohólicos y heptánicos de las hojas de *L. utilis* y *M. elliptica* ya que prolongó el tiempo de coagulación del plasma en 3min 38 segundos siendo este el tiempo más largo comparado con los otros extractos y en la hemólisis el extracto alcohólico de las hojas de *L. utilis* representa mayor actividad neutralizante principalmente para dicho efecto. Sin embargo, los extractos alcohólicos de *L. utilis* fueron los mejores en la neutralización de la actividad coagulante y hemolítica mientras que los extractos heptánicos de *L. utilis* y *M. elliptica* resultaron tener baja capacidad de neutralización frente a la coagulación y hemólisis.

El extracto que representa mayor efecto anti proteolítico es el extracto heptánico de las hojas de *M. elliptica* ya que demostró tener valores menores en U/mg (unidades de proteólisis /mg), aunque este extracto no obtuvo gran cantidad de fenoles y flavonoides como en la raíz y hojas de *L. utilis* en esta actividad realizada in vitro obtuvo el mejor resultado por lo que pudo ocurrir que tenga más potencial alexitéro cuando los fenoles y flavonoides trabajaron en conjunto con los taninos provocando algún cambio en las proteínas del veneno de *B. atrox*; por lo tanto también se demostró que por esta sinergia de los componentes de esta planta existieron cambios en el perfil proteico dando así nuevas bandas de proteínas.

En *L. utilis* y *M. elliptica* los extractos alcohólicos fueron más eficientes que los heptánicos, pero ambos indican que sí existe actividad inhibitoria para los efectos del veneno de *B. atrox* como la actividad coagulante y actividad hemolítica. Mientras que para la actividad proteolítica fue el extracto heptánico de *M. elliptica* por el mismo hecho de que los componentes de la planta trabajaron conjuntamente para inhibir este efecto por lo que se debería tomar en cuenta en otros estudios otros tipos de compuestos que ayuden a tener una visión más clara de cómo interaccionan entre sí.

La actividad neutralizante de los extractos de *L. utilis* y *M. elliptica* se demostró en las pruebas *in vitro* sobre sangre humana, estas son la coagulación y hemólisis; en el cual *Lonchocarpus utilis* demostró ser la mejor especie en dichas pruebas ya que en todas las ensayos manifestó obtener los mejores resultados en comparación con

Mucuna elliptica y en cuanto a la actividad proteolítica *M. elliptica* demostró tener mayor capacidad inhibitoria frente a este efecto.

En cuanto a las modificaciones del gel en el perfil proteico de la electroforesis SDS-page los extractos heptánicos tuvieron mejores resultados debido a que aparecieron nuevas bandas; entre las más importantes están las del extracto de hojas de *M. elliptica* con peso de 43.1 kDA, las hojas de *L. utilis* con bandas de 98.1 kDA, 50.6 kDA y 41.4 kDA; y para la raíz de *L. utilis* bandas con 96.1 kDA, 63.1 kDA, 48.6 kDA, 39.8 kDA y 10.2 kDA.

En definitiva tanto los extractos de *Lonchocarpus utilis* y *Mucuna elliptica* obtienen una capacidad inhibitoria frente a los efectos del veneno de *B. atrox* por lo que se comprueba que los nativos indígenas de las comunidades amazónicas de nuestro país tienen razón al utilizar estas especies como antiviperinas ya que se ha demostrado que en cada efecto como la coagulación, la hemolisis y proteólisis estas plantas han inhibido gran parte de estas actividades pero de cierta manera hay que seguir realizando más estudios acerca de la composición fitoquímica de estas especies vegetales para poder tener una visión más clara de cómo actúan los componentes vegetales con cada una de las proteínas del veneno.

Desde luego la aplicación de *Lonchocarpus utilis* y *Mucuna elliptica* como plantas alexíteras es una buena idea ya que se ha visto que tienen la capacidad de mitigar o reducir los efectos del veneno de *B. atrox*.

Referencias

- Abdel-shafy, H., & Mohamed- Mansour, M. (2017). Polyphenols : Properties , Occurrence , Content in Food and Potential Effects. *ResearchGate*.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Signaling Pathways That Depend on Regulated Proteolysis. In *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York: Garland Science. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26918/>
- Alperin, S. E., Bonino, E. E., Bruno, G., & Reati, G. J. (2015). *Manual de fundamentos teorico-prácticos sobre ofidios y ofidismo en Córdoba. Para la enseñanza secundaria* (1a ed.). Córdoba: Grupo Editor.
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2003). *Biología : la vida en la tierra*. Pearson Educación.
- Avendaño, K. (2016). *Accidente ofídico, manejo clínico y sus complicaciones en el área de emergencia del Hospital Martín Icaza de Babahoyo en el período 2013-2014*. Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Badilla, B., Chaves, F., Poveda, L., Jiménez, S., & Rodríguez, G. (2006). Efecto de plantas usadas etnomédicamente sobre la actividad hemorrágica y proteolítica inducida por *Bothrops asper*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11(1), 1–7.
- Báez, A.; Teibler, P.; Merlo, W.; Burna, A.; Acosta Badaró, M.; Solana, M.; Infuleski, R.; Acosta de Pérez, O. (2008). Caso clínico: Lesiones sistémicas en un canino

por intoxicación ofídica. *Argos Veterinaria*, (3400), 2–5.

Baldo, C., Jamora, C., Yamanouye, N., Zorn, T. M., & Moura-da-Silva, A. M. (2010). Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tissue distribution and in Situ hydrolysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000727>

Barranco, W. (2010). *Especies vegetales de uso antiofídico en las estribaciones de la sierra nevada de santa marta: inventario etnobotánica y evaluación biológica*. Universidad Nacional de Colombia.

Betancourt, R. (2012). *Incidencia, zonas de riesgo y prevención de accidentes ofídicos en áreas rurales de Manabí y los Ríos, Ecuador. Años 2007 a 2009*. Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

BIOPAT. (2015). *Barbasco*. Retrieved from https://www.indecopi.gob.pe/documents/20791/202940/03.-Boletin_N3_LONCHOCARPUS_NICOU.pdf/9f30f523-b4a5-47fc-985f-8190ac7e0d5b

Bioted. (2014). *Determinación Del Peso Molecular de Proteínas*. Retrieved from <http://bioted.es/protocolos/DETERMINACION-PESO-MOLECULAR-PROTEINAS.pdf>

Brandan, N., Aguirre, M., & Giménez, C. (2008). *Hemoglobina*. Retrieved from https://docs.moodle.org/all/es/images_es/5/5b/Hemoglobina.pdf

Bustamante, G., & Ticona, Y. (2014). Trombosis- Embolia. Patología. *Revista de Actualización Clínica*, 43, 2287–2290. Retrieved from

http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v43/v43_a09.pdf

Camargo, F., Torres, A. M., Ricciardi, G., Ricciardi, A., & Dellacassa, E. (2011). SDS-PAGE: una herramienta útil en la evaluación preliminar de la actividad alexítera de extractos vegetales. *Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(5), 429–434. Retrieved from http://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/006_camargo.pdf

Carrillo, E., Aldás, M., & Altamirano, E. (2005). *Lista de reptiles de Ecuador* (Serie Proyecto PEEPE). *Lista Roja de los Reptiles del Ecuador*. Quito. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Carrión, A., & García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica*. Univercidad de Cuenca, Ecuador.

Cartujano, B., Guadarrama, L., Mendoza, M., & Mondragón, G. (2008). *Venenos de serpiente: México*. Retrieved from <http://acmor.org.mx/cuam/2008/209fosfolipasa.pdf>

Castro, K., Castro, I., Flores, G., Mejía, J., Rodríguez, B., & Arévalo, A. C. (2014). Antídoto contra mordedura de serpiente en la comunidad de Lancetilla. *Revista Portal de La Ciencia*, 6, 44–53.

Céspedes, J., Barco, N., & Arnez, M. (2011). ACCIDENTE OFÍDICO POR SERPIENTE CASCABEL: A PROPÓSITO DE UN CASO OPHIDIC ACCIDENT CAUSED BY RATTLESNAKE: APROPOS OF A CASE. *Rev Méd-Cient “Luz Vida”*, 2(1), 68–71. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/3250/325028222014.pdf>

Chavarro, A., & Lozano, J. (2014). *Propiedades físicas y químicas de los alcoholes aldehídos y éteres.*

Córdova, G., & Santos, D. (2013). *Factores asociados con las complicaciones de un accidente ofídico en pacientes que ingresaron al Hospital General Puyo de la provincia Pastaza en el período enero 2007 a diciembre 2013.* Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Creagh, I., Pérez, Y., Gámez, D., & Dueñas, O. (2017). Características clínico epidemiológicas de los accidentes ofídicos. Ecuador, 2014. *Intramed Journal*, 6(1), 1–7. Retrieved from http://journal.intramed.net/index.php/Intramed_Journal/article/viewFile/540/256

Cristovão, S. (2013). *Contribuição Química para Aristolochia trilobata Volaris e obtenção de acetato de 6-metil-5-hepten-2-il por Biotransformação.* Universidade Federal de Sergipe. Retrieved from https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/6035/1/DARLISSON_ALEXANDRIA_SANTO_S.pdf

Cueva, J. (2017). *Inhibición de la actividad hemolítica del veneno de Bothrops atrox por los extractos de Tabernaemontana sananho Ruiz & Pav. y Mucuna cf. elliptica (Ruiz&Pav.) DC.* Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.

Delgadillo, J., Palomino, M., Lazo, F., Rodríguez, E., González, E., & Severino Armando Yarlequé, R. (2013). PURIFICACIÓN Y ALGUNAS PROPIEDADES DE UNA HIALURONIDASA DEL VENENO DE LA SERPIENTE Bothrops brazili “JERGÓN SHUSHUPE.” *Rev Soc Quím Perú*, 79(4), 30–9. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v79n4/a06v79n4.pdf>

Di Terlizzi, R. (2012). Hemolysis. In C. Wiedmeyer (Ed.), *Clinical Veterinary Advisor* (p. 939). Missouri: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-9979-6.00405-0>

Duque, C., Fernández, I., Vargas, A., López, J. C., & Scannone, H. (2014). Caracterización toxinológica del veneno de *Bothrops atrox* de puerto ayacucho, edo. Amazonas (Venezuela) y su neutralización por un antiveneno venezolano. *Revista Científica*, 24(4), 355–362. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/959/95931404004.pdf>

FarmaQuímica Sur. (2018). Extractos secos, fluidos y glicólicos. Retrieved July 18, 2018, from <http://www.farmaquimicasur.com/extractos-secos-fluidos-glicolicos/>

Fernández, A., Espurz, A., Lavilla, F., Lavona, M., & Diaz, R. (1994). *Información Tecnológica*. (J. Valderrama, Ed.). La Serena-Chile: Centro de Informacion Tecnologica (CIT). Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=IXu07jMewFwC&pg=PA67&lpg=PA67&dq=extractos+con+heptano&source=bl&ots=MQqjhGnv51&sig=aAWD4njIcUZMW9R9bPa71lHT1bY&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjY4LyVn7TcAhWKwFkKHa6hCEAQ6AEwAnoECAMQAAQ#v=onepage&q=extractos con heptano&f=false>

Fernández, M., Ortiz, W., Pereañez, J. A., & Martínez, D. (2010). EXTRACTO ETANÓLICO Y FRACCIONES OBTENIDAS DE *Renealmia alpinia* (Rottb) Mass (Zingiberaceae) CULTIVADA in vitro. *Revisra Vitae*, 17(1), 75–82.

Ferrari, M., Gallo, V., Ghidini, R., & Verón, J. (2011). Accidente por mordedura de ofidios venenosos. *Revista de Posgrado de La Vía Cátedra de Medicina*, 208,

14–20. Retrieved from https://med.unne.edu.ar/revista/revista208/5_208.pdf

Foil, C. (2012). *Sistema Venezolano de Información sobre Diversidad Biológica*.

Retrieved from

<http://diversidadbiologica.minamb.gob.ve/especies/ficha/10/13374/>

Garrido, G., Ortiz, M., & Pozo, P. (2013). Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F.Phil. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 1(1), 30–38. Retrieved from <http://jppres.com/jppres>

Gennaro, A. R., Remington, J. P. (Joseph P., & Belluci, S. (2003). *Remington farmacia*. Editorial Médica Panamericana.

Gómez, I. (2015). *Estudio de las actividades analgésica e inhibitoria de los efectos tóxicos del veneno de Bothrops asper por extractos y compuestos aislados de Renealmia alpinia silvestre*. Universidad de Antioquia.

González-Andrade, F., & Chippaux, J. P. (2010). Snake bite envenomation in Ecuador. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(9), 588–591. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.05.006>

González, A. (2004). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf>

Grandtner, M., & Chevrette, J. (2013). *Dictionary of South American trees : nomenclature, taxonomy and ecology. Volume 2*. Canada: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2011-0-05180-3>

- Grünwald, O. (2000). La Industria del Barbasco y sus perspectivas para Venezuela. Retrieved March 4, 2018, from <http://www.bdigital.unal.edu.co/33936/1/33910-128303-1-PB.pdf>
- Gualán, S. (2011). *Caracterización epidemiológica y clínica de los pacientes que presentaron accidente ofídico, atendidos en el “Hospital Marco Vinicio Iza” de la provincia de Sucumbíos, durante el período de enero a diciembre del año 2010*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/4105/T-PUCE-3383.pdf?sequence=1>
- Guamán, I., & Cabrera, R. (2012). Medicina de pacientes víctimas de accidente ofídico en el Hospital Quito de Méndez en el período enero a junio 2012.pdf. *Revista Médica HJCA*, 4(2), 1–6.
- Gutiérrez, J. M. (2015). Understanding and confronting snakebite envenoming: The harvest of cooperation. *Toxicon*, 109, 51–62. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.013>
- Gutiérrez, J. M., Chaves, F., & Bolaños, R. (1980). Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Revista de Biología Tropical*, 28(2), 341–351.
- Hermosilla, V., & Hernández, A. (2014). *Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala* *Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Infante, J. (2002). *La línea recta. Geometría analítica*. Retrieved from [https://expediente.ues.edu.sv/uiu/elementos_estudio/matematica/Jesus Infante Murillo - Geometria Analitica/2. Linea Recta.pdf](https://expediente.ues.edu.sv/uiu/elementos_estudio/matematica/Jesus%20Infante%20Murillo%20-%20Geometria%20Analitica/2.%20Linea%20Recta.pdf)

INSHT. (2007). *HEPTANO DOCUMENTACIÓN TOXICOLÓGICA PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL LÍMITE DE EXPOSICIÓN PROFESIONAL DEL HEPTANO*. Retrieved from [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valores_Limite/Doc_Toxicologica/FicherosSerie2/DLEP 35.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valores_Limite/Doc_Toxicologica/FicherosSerie2/DLEP%2035.pdf)

Jiménez, J. (2015). *BIOQUIMICA, FARMACOLOGIA y FISIOPATOLOGIA DE LOS VENENOS DE SERPIENTES*.

Jiménez, S. (2012). Uso de plantas como opción terapéutica en mordeduras de serpientes. *Vitae*, 19(Supl. 2), S62–S63. Retrieved from <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/download/13023/11743#page=25>

Kadir, M. F., Karmoker, J. R., Alam, M. R., Jahan, S. R., Mahbub, S., & Mia, M. M. K. (2015). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by traditional healers and indigenous people in Chittagong Hill Tracts, Bangladesh, for the treatment of snakebite. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/871675>

Kewscience. (2017). *Mucuna elliptica DC. / Plants of the World Online / Kew Science*. Retrieved from <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:509185-1>

- Kougan, G. B., Tabopda, T., Kuete, V., & Verpoorte, R. (2013). Simple Phenols, Phenolic Acids, and Related Esters from the Medicinal Plants of Africa. In *Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry* (pp. 225–249). Holanda: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00006-0>
- Laemmli, S. (1970). *SDS-PAGE*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/...SDS-PAGE>.
- León, K. (2017). *Actividad alexítera de Tabernaemontana sananho Ruiz & Pav. (Kunapi) y Minthostachys cf. mollis (kunth) Griseb (Kurarina) sobre el veneno de Bothrops atrox ("Pitalala")*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (1983). La actividad Proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Revista de Biología Tropical*, 31(1), 37–40. Retrieved from http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/9245/1983_Venoms_RevBi olTrop_proteolytic_activity.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- López, D. (2013). *Utilidad de antibiótico terapia en relación a la presentación de complicaciones en accidente ofídico de pacientes atendidos en el hospital provincial Puyo periodo enero 2012-Agosto 2012*. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/5871/1/Lopéz Brito, Diego Mauricio.pdf>
- López, J., & Pérez, J. (2009). Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. *Medicina Naturista*, 3(5), 17–24.

- López, S. (2016). Pruebas de coagulación. *ActaPediatr Mex*, 4(37), 241–245.
Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/apm/v37n4/2395-8235-apm-37-04-00241.pdf>
- Maldonado, A. M., & Jorrín, J. V. (2001). Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales*, 1–16. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mariños, C., Castro, J., & Nongrados, D. (2004). Efecto biocida del «barbasco» *Lonchocarpus utilis* (Smith,1930) como regulador de larvas de mosquitos. *Revista Peruana de Biología*, 11(1), 87–94. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332004000100011
- Martínez, C. (2006). Mecanismos de activación de la coagulación. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 44(2), 51–58. Retrieved from [http://cleuadistancia.cleu.edu.mx/cleu/flash/PAG/lecturas/hematologia/Mecanismos de activaci%F3pn de la coagulaci%F3n.pdf](http://cleuadistancia.cleu.edu.mx/cleu/flash/PAG/lecturas/hematologia/Mecanismos%20de%20activaci%F3pn%20de%20la%20coagulaci%F3n.pdf)
- Martínez, J. D., Riojas, A., & Rendón, M. E. (2017). Clinical significance vs statistical significance . How to interpret the confidence interval at 95 %. *Revista Alergia México*, 64(4), 477–486.
- Martinuzzo, M. (2017). Sistema de coagulación. Blood Coagulation System Physiology. *Hematologia*, 21, 31–42. Retrieved from [http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/08-Vol 21-extra.pdf](http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/08-Vol%2021-extra.pdf)

- Masaquiza, D. (2015). *Guía de atención médica a pacientes intoxicados con barbasco en el Hospital José María Velasco Ibarra. Junio-Agosto 2014*. Universidad Regional Autónoma de los Andes, Ecuador.
- Melero, A., Perucho, S., & Reyes, R. (2010). " Deontología y veterinaria legal". *Tenencia de Serpientes Venenosas: "El Vací, Legal,"* 1–100.
- Mencías Rodríguez, E., & Mayero Franco, L. M. (2000). *Manual de toxicología básica*. Ediciones Díaz de Santos.
- Mendoza, J., Vivas, D., Inga, R., Arbaiza, E., Rodríguez, E., & Yarlequé, A. (2009). Patrones Electroforéticos De Los Venenos De Serpientes Peruanas De Los Géneros Bothrops and Lachesis. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 75(2), 235–242.
- Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. (2014). *Guía de Prevención, Diagnóstico, Tratamiento y Vigilancia Epidemiológica de los Envenenamientos Ofídico* (Vol. 34). Buenos Aires: 1a.
- MNHN. (2018). *Mucuna elliptica* (Ruiz & Pav.) DC. Retrieved from <https://science.mnhn.fr/taxon/species/mucuna/elliptica>
- Moncerrate, T., & Vergara, P. (2013). *Tesis De Grado Previo a La Obtención Del Título De Ingeniero Agrónomo Otorgado Por La Universidad Estatal De Bolívar, a Través De La Facultad De Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales Y Del Ambiente, Escuela De Ingeniería Agronómica*. Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda, Ecuador.
- Montoro, J. B., Segarra, A., López, R., & Monterde, J. (2013). *Nefrología. Farmacia*

<https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP12.pdf>

Mora, T. (2015). *Propuesta de implementación de procedimientos operativos estándar (POE) en la línea de producción de tabletas en base de silimarina, contenida en Silybum marianum (CARDO MARIANO)*. Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

Moura, T. M., Mansano, V. F., Torke, B. M., Lewis, G. P., & Tozzi, A. M. G. A. (2013). A Taxonomic Revision of *Mucuna* (Fabaceae: Papilionoideae: Phaseoleae) in Brazil. *Systematic Botany*, 38(3), 631–637. <https://doi.org/10.1600/036364413X670458>

MSP de Ecuador. (2008). Manual de Normas y Procedimientos sobre Prevención y Tratamiento de Accidentes Ocasionados por mordedura de Serpientes, 6. Retrieved from <https://bibliotecapromocion.msp.gob.ec/greenstone/collect/promocin/index/assoc/HASH32e5.dir/doc.pdf>

Muñoz, J. (2014). *Cuantificación de flavonoides, expresados como quercetina total, en algunos extractos y soluciones de uso oral a base de Calendula officinalis*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/58466/1/1144030736.2014.pdf>

Natarajan, K., Narayanan, N., & Ravichandran, N. (2012). Review on “Mucuna” - The wonder plant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 17(1), 86–93.

- Orozco, C. (2004). *Elección de las condiciones más adecuadas para la obtención de extractos de plantas superiores con actividad sobre una cepa de Staphylococcus aureus resistente*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/6668/1/1080123958.PDF>
- Ortiz, C., Gutiérrez, D., & Olmos, A. (2015). *Cuantificación de fenoles totales en Amaranthus hybridus, Cosmos bipinnatus y Cynodon dactylon plantas malezas del Estado de Querétaro*. ResearchGate. Querétaro, México.
- Ortiz, C., Lazo, F., Bellido, C., Gonzales, E., & Yarleque, A. (2012). Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente Bothrops atrox “jergon”, de tres zonas geográficas del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 29(2), 198–205. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342012000200005>
- Osorio, J. H., Quenán, Y. E., & Gómez, W. B. (2013). Evolución y cambios en el sistema de la coagulación sanguínea. Una reflexión Evolution and changes in the blood coagulation system: A reflection, 15(2), 225–237. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v15n2/v15n2a13.pdf>
- Padilla, J. (2013). *ANOVA : Interpretación de los resultados*. Bogotá.
- Páramo, J. (2012). Sistema hemostático: fisiopatología y aproximación clínica y diagnóstica. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(22), 1327–1336. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(12\)70459-6](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(12)70459-6)
- Patiño, A. C., López, J., Aristizábal, M., Quintana, J. C., & Benjumea, D. (2012). [Evaluation of the inhibitory effect of extracts from leaves of Renealmia alpinia

- Rottb. Maas (Zingiberaceae) on the venom of *Bothrops asper* (mapaná)]. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 32(3), 365–374. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572012000300007>
- Pazmiño-Otamendi, G. (2013). ReptiliaWebEcuador - Ficha de la especie: *Bothrops atrox*. Retrieved August 28, 2017, from <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/reptiles/FichaEspecie.aspx?Id=1621>
- Pazmiño, G., & Torres, O. (2013). *Bothrops atrox*. Retrieved from <https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Bothropsatrox>
- Pereañez, J. A., Jimenez, S., Quintana, J., Nuñez, V., Fernandez, M., & Restrepo, Y. (2008). Inhibition of proteolytic, coagulant and indirect hemolytic activities induced by *Bothrops asper* venom, by ethanolic extracts from three heliconias species. *Vitae*, 15(1), 157–164. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v15n1/v15n1a19.pdf>
- Pereañez, J., Patiño, A., & Henao, I. (2014). Toxinas provenientes de venenos de serpiente: blancos terapéuticos, herramientas en investigación biomédica y agentes con potencial terapéutico. *Curare*, 1(1), 49–60.
- Pontificia Universidad Católica del Ecuador. (2017). Herbario QCA. Retrieved March 5, 2018, from <https://www.puce.edu.ec/portal/content/IndexHerbariorum>
- Porras, A., & López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 121–134. Retrieved from [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf)

- Praba-Egge, A. D., Cone, S. W., Araim, O., Freire, I., Paidá, G., Escalante, J., ... Merrell, R. C. (2003). Snakebites in the rainforests of Ecuador. *World Journal of Surgery*, 27(2), 234–40. <https://doi.org/10.1007/s00268-002-6552-9>
- Ramos, M., Ávila, C., & Morales, J. (2007). Etnobotánica y ecología de plantas utilizadas por tres curanderos contra la mordedura de serpiente en la región de Acayucan, Veracruz, México. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, 81, 89–100.
- Reyes, M. (2017). *Inhibición de la actividad hemolítica del veneno de Bothrops atrox por los extractos de Lonchocarpus utilis A.C. Sm y Adesnotemma lavenia L. (Kuntze)*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Ricciardi, B., Torres, A., Camargo, F., & Dellacassa, E. (2016). Validación del uso tradicional de especies de *Asclepias* contra el veneno de *Bothrops diporus* (yaráchica) en el Nordeste de Argentina. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 15(2), 112–121.
- Ríos, M. (2012). ESTADO ACTUAL DE LA INFORMACION SOBRE PRODUCTOS FORESTALES NO MADEREROS. Retrieved July 6, 2018, from <http://www.fao.org/docrep/006/AD396S/AD396s11.htm>
- Rojas, R., Ramírez, R., Cobos, M., Castro, J., & Castro, J. (2011). Análisis electroforético de proteínas del veneno de *Bothrops atrox* “jergón” (Ofidia: Viperidae) de distintas zonas geográficas de la Amazonia Peruana. *Revista EciPerú*, 8(2), 226–229. Retrieved from http://www.guzlop-editoras.com/web_des/bio01/biolmole/pld0372.pdf

- Romão, W. (2014). Efeito dos solventes orgânicos sobre o comportamento físico-químico do polietileno de alta densidade (PEAD) e polipropileno (PP). *Polímeros Ciência e Tecnologia*, 24(3), 300–306. <https://doi.org/10.4322/polimeros.2014.045>
- Sánchez, M., Izquierdo, A., & Hurtado, F. (2013). Metahemoglobinemia secundaria a la administración tópica de anestésico local para depilación láser. *Farm.Hosp*, 37, 558–561. <https://doi.org/10.7399/FH.2013.37.6.969>
- Saravia, P., Mérida, M., García, G., Pernillo, L., Hernández, R., Cruz, S., ... Gutiérrez, J. M. (2017). *Neutralización de los efectos coagulante, fosfolipasa a2 y proteolítico del veneno de Bothrops asper por extractos de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional centroamericana*. Retrieved from <http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puiis/INF-2016-28.pdf>
- Secretaría de Salud. (2017). *Diasnóstico y Tratamiento de las Mordeduras de Serpientes Venenosas*. México.
- Solís, C. R., Nogués, M. P., Ruiz, M. L. D. V., & Cerezo, M. T. E. (2008). Estudio del veneno de serpientes: tipos y tratamientos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2(2), 100–104. <https://doi.org/->
- Soto Vásquez, M. R. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. *In Crescendo*, 6(1), 33–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.21895/in%20cres.v6i1.824>
- Sumpa, P. (2012). *Plantas medicinales y su tratamiento en la mordedura de serpiente*

en la comunidad Achuar Kaipatch. El Escorial. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

The New York Botanical Garden. (2018). *Specimen Details:Mucuna elliptica (Ruiz & Pav.) DC.* New York. Retrieved from http://sweetgum.nybg.org/science/vh/specimen_details.php?irn=660365

Theakston, R. D. G., & Reid, H. A. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms*. *Bulletin Ofthe WorldHealth Organization*, 61(6), 949–956. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2536230/pdf/bullwho00102-0061.pdf>

Tighe, R., Díaz, R., Leonelli, G., Iglesias, C., Martínez, M., Morales, D., & Mejías, P. (2016). Efecto de extractos de *Ulex europaeus* L. en la producción de biomasa de plántulas de ají (*Capsicum annuum* L.), en condiciones de laboratorio. *Idesia (Arica)*, 34(ahead), 19–25. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016005000022>

Torres, A., Camargo, F., Ricciardi, B., Ricciardi, G., & Dellacassa, E. (2014). *Plantas como antiveneno: del mito al logos* (Ediciones). Montevideo: Comisión Sectorial de Investigación Científica (csic) de la Universidad de la República.

Torres de Sosa, A., Camargo, F., Avanza de Temporetti, M., Tressens, S., & Ricciardi, A. (2004). *Interacción entre extractos de órganos de plantas y veneno de Bothrops neuwiedi diporus Cope (Yarará chica)*. Buenos Aires. Retrieved from <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/8-Exactas/E-059.pdf>

Towle, M. (2017). *The Ethnobotany of Pre-Columbian Peru*.

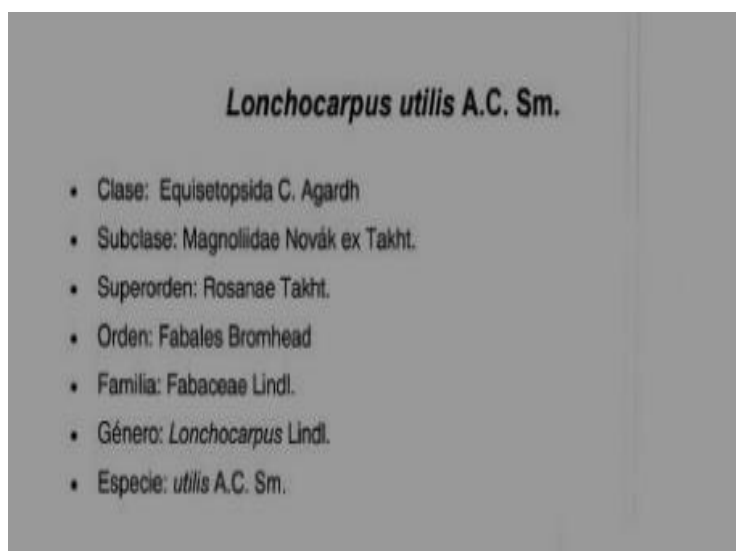
- Varas, D. (2004). *Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica HPLC*. Universidad Austral de Chile, Chile.
- Vásquez, J. (2012). *Neutralización del veneno de Bothrops asper con plantas de la familia Zingiberaceae utilizadas en la etnobotánica del accidente ofídico en el oriente antioqueño*. Universidad de Antioquia.
- Yarlequé, M. (2016). *Aislamiento y caracterización bioquímica de compuestos fenólicos con actividad anticoagulante del extracto alcohólico de las hojas de Oenothera rosea Aiton "chupasangre."* Repositorio de Tesis - UNMSM. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/handle/cybertesis/4990>
- Zambelli, V. O., Picolo, G., Fernandes, C. A. H., Fontes, M. R. M., & Cury, Y. (2017). Secreted phospholipases A2 from animal venoms in pain and analgesia. *Toxins*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/toxins9120406>
- Zambudio, M. (2015). *Determinación De La Actividad Coagulante De Cuajos Aplicación*. Retrieved from http://www.cerpta.com/esp/castella/Determinacion_actividad_coagulante.pdf
- Zamora, G. (2015). *Incidencia de casos de accidentes ofídicos en los subcentros de salud de san miguel de los bancos, Pedro Vicente Maldonado y Puerto Quito de septiembre 2013 a septiembre 2014*. Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Zelaya, M., & Díaz, A. (2017). *"Cumplimiento del protocolo para el manejo de intoxicaciones agudas por mordedura de serpiente en pacientes atendidos en el"*

Hospital Victoria Motta-Jinotega, 2014- 2015.” Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua.

Zuñiga-Carrasco, I. R., & Caro-Lozano, J. (2013). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México. *Evidencia Médica e Investigaciones En Salud*, 6(4), 125–136.

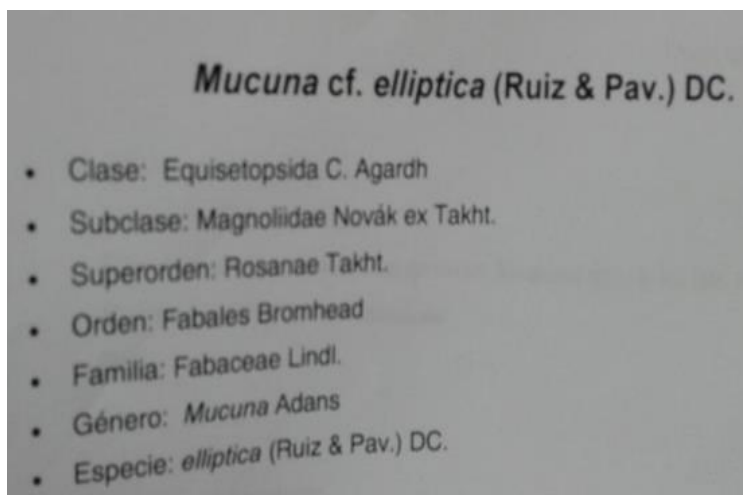
Anexos

Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm (Barbasco)



Nota: tomado del Herbario QCA (2017) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Anexo 2. Certificado de identificación taxonómica de *Mucuna cf. elliptica* (Wapaá)



Nota: tomado del Herbario QCA (2017) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Anexo 3. Porcentaje de rendimiento para extractos alcohólicos

Extracto alcohólico	Peso muestra (g)	Peso del vaso vacío (g)	Peso del vaso más extracto	(%) Rendimiento
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	15.0517	189.8534	190.4402	3.90
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	15.2822	149.0001	150.1002	7.20
<i>Mucuna cf. Elliptica</i> (hojas)	15.2995	156.3826	156.6957	2.05

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 4. Porcentaje de rendimiento para extractos heptánicos

Extracto Heptánico	Peso muestra (g)	Peso del vaso (g)	Peso del vaso más extracto	(%) Rendimiento
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	14.602	104.7904	105.1211	2.26
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	15.2387	142.0867	142.6968	4.00
<i>Mucuna cf. Elliptica</i> (hojas)	15.125	152.0773	152.2201	0.94

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 5. Datos para la curva de calibración de ácido gálico

Patrones (mg/mL)	Estándares (ml)	Absorbancias (nm)			Media	ppm
		A1	A2	A3		
0	0	0	0	0	0.0000	0.00
1	0.02	0.0532	0.055	0.0552	0.0545	0.50
2	0.04	0.0861	0.0864	0.0864	0.0863	1.00
3	0.06	0.1668	0.1673	0.1675	0.1672	1.50
4	0.08	0.264	0.2646	0.2647	0.2644	2.00
5	0.1	0.3254	0.3249	0.3249	0.3251	2.50
6	0.12	0.3792	0.3793	0.3794	0.3793	3.00
7	0.14	0.4433	0.4435	0.4436	0.4435	3.50

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 6. Curva de calibración de fenoles que representa ppm de ácido gálico vs absorbancias

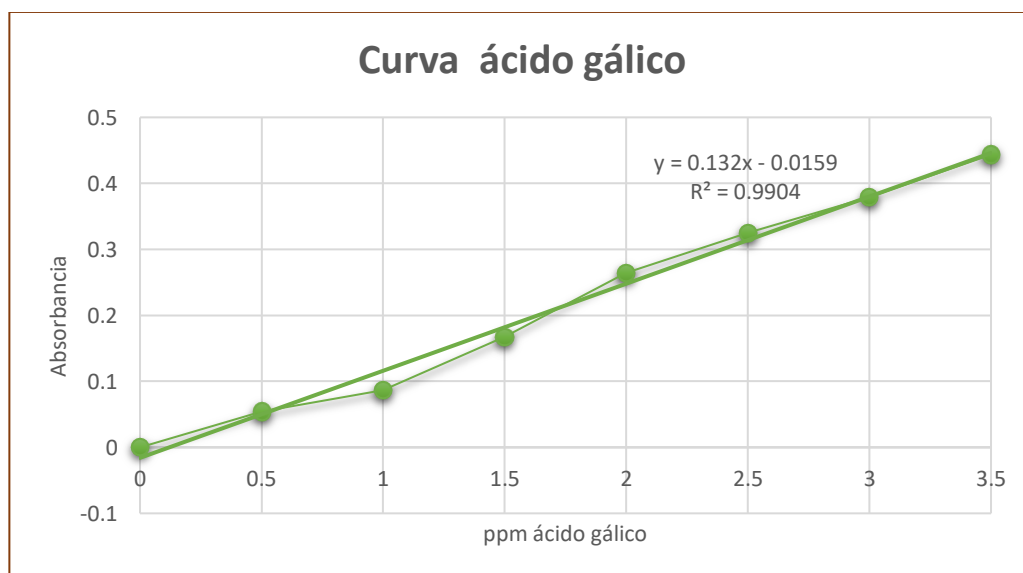


Figura 11: curva de calibración de flavonoides totales

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 7. Absorbancias y contenido de flavonoides en ppm de los extractos alcohólicos de *Mucuna cf. elliptica* y *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm

	Absorbancias (nm)				
Extractos alcohólicos	A1	A2	A3	Media	ppm
<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	1.2748	1.2522	1.2439	1.2570	9.6429
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	0.964	0.9598	0.9612	0.9617	7.4058
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raiz)	2.1504	2.134	2.1321	2.1388	16.3237

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 8. Datos para la curva de calibración de quercetina

Estándares (mg/mL)	Concentración de quercetina (mg)	Absorbancias (nm)				ppm
		A1	A2	A3	Media	
0	0	0	0	0	0	0
1	0.027	0.1509	0.1511	0.1510	0.1510	0.0304
2	0.047	0.2371	0.2370	0.2371	0.2371	0.0457
3	0.094	0.4485	0.4476	0.4479	0.4480	0.0833
4	0.189	1.0690	1.0715	1.0704	1.0703	0.1942

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 9. Curva de calibración de flavonoides que representa ppm de ácido gálico vs absorbancias

Curva de calibración para quercetina

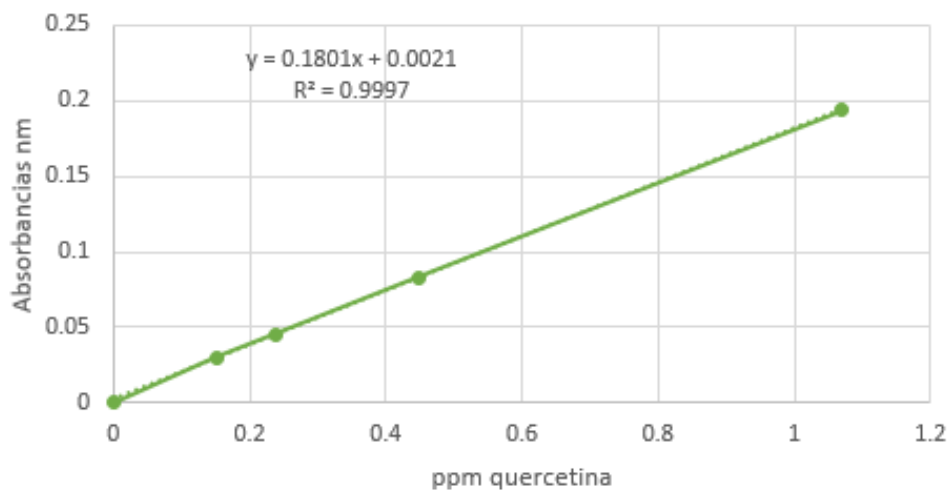


Figura 12: curva de calibración de fenoles totales

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 10. Absorbancias y contenido de flavonoides en ppm de los extractos alcohólicos de *Mucuna cf. elliptica* y *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm

Extractos alcohólicos	Absorbancias (nm)			Media	ppm
	A1	A2	A3		
<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	1.8915	1.8964	1.8958	1.8946	10.5079
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	3.776	3.7693	3.7727	3.7727	20.9360
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	3.9203	3.878	3.8503	3.8829	21.5478

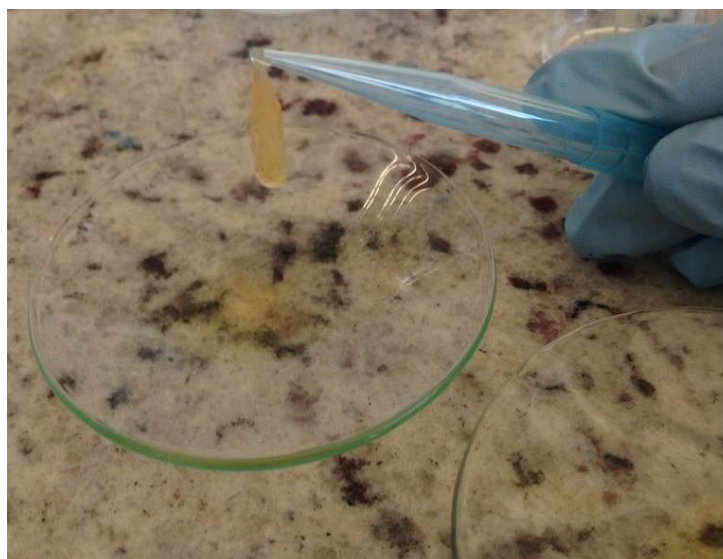
Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 11. Actividad coagulante del veneno de *Bothrops atrox* sobre plasma sanguíneo



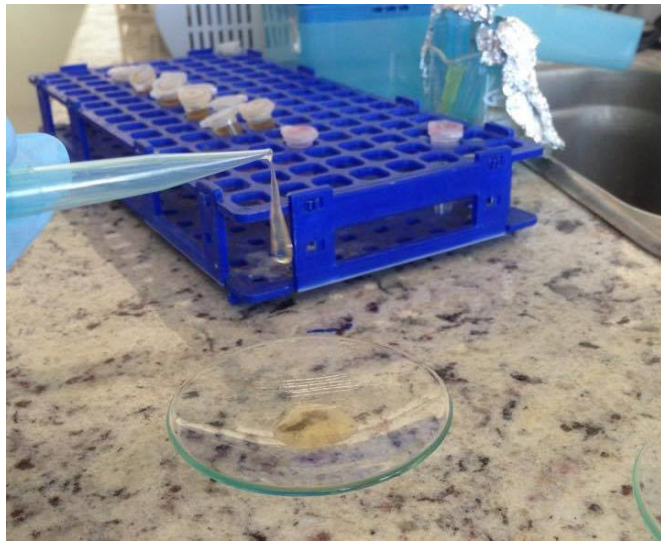
Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 12. Actividad coagulante del veneno de *Bothrops atrox* con adición de los extractos de *Mucuna cf. elliptica* sobre plasma sanguíneo.



Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 13. Actividad coagulante del veneno de *Bothrops atrox* con adición de los extractos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm sobre plasma sanguíneo.



Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 14: Absorbancias de la prueba de hemólisis del veneno de *Bothrops atrox* + extractos heptánicos de *Mucuna cf. elliptica* y *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm

EXTRACTO HEPTÁNICO	Especie vegetal	Absorbancia (nm)	Media	(%) Hemólisis
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	2.8889	2.9265	132.13
		2.9444		
		2.9462		
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	2.1282	2.1385	96.55
		2.14		
		2.1472		
	Especie vegetal	Absorbancia (nm)	Media	(%) Hemólisis
	<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	1.3653	1.3651	61.64
		1.3656		
1.3645				
Blanco: 2.2148				

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 15. Absorbancias de la prueba de hemólisis del veneno de *Bothrops atrox* + extractos alcohólicos de *Mucuna cf. elliptica* y *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm

EXTRACTO ALCOHÓLICO	Especie vegetal	Absorbancia	Media	(%) Hemólisis
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	0.4327	0.4340	19.60
		0.4335		
		0.4357		
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	1.199	1.2256	55.34
		1.2447		
		1.2331		
	Especie vegetal	Absorbancia	Media	(%) Hemólisis
	<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	0.6444	0.6264	28.28
		0.6348		
		0.5999		
Blanco: 2.2148				

Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 16. Absorbancias de la prueba de proteólisis del veneno de *Bothrops atrox* + extractos heptánicos *Mucuna cf. elliptica* y *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm

EXTRACTO HEPTÁNICO	Especie vegetal	Absorbancia (nm)	Media	Blanco +	Unidades/mg
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	0.4748	0.3723	0.0769	295.33
		0.3662			
		0.2758			
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	0.4056	0.5664	0.0769	489.5
		0.4273			
		0.8664			
	Especie vegetal	Absorbancia (nm)	Media	Blanco +	Unidades/mg
	<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	0.1517	0.1313	0.0769	54.37
		0.122			
		0.1202			
Blanco +: ATA + veneno + caseína					

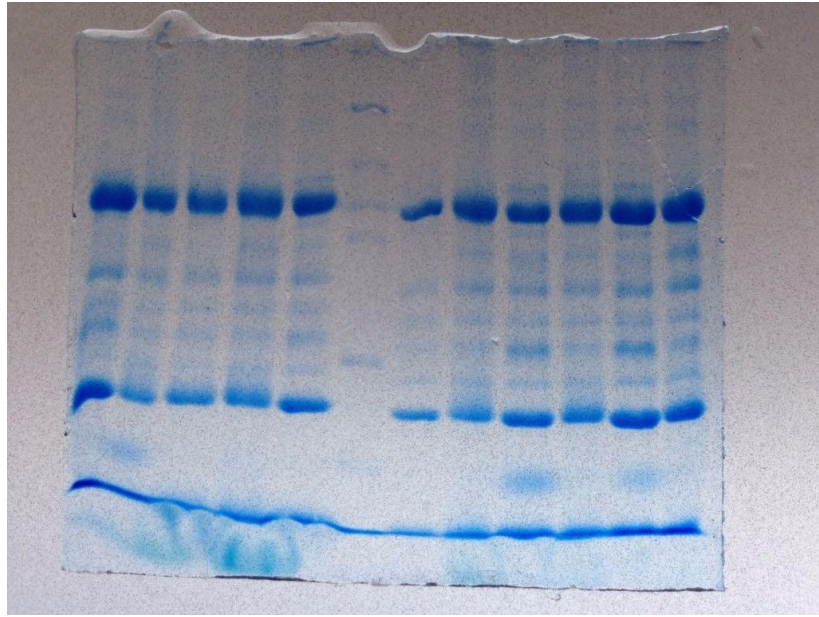
Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 17. Absorbancias de la prueba de proteólisis del veneno de *Bothrops atrox* + extractos alcohólicos *Mucuna cf. Elliptica* y *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm

EXTRACTO ALCOHÓLICO	Especie vegetal	Absorbancia (nm)	Media	Blanco +	U/mg
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	0.1827	0.1647	0.0769	87.73
		0.1317			
		0.1796			
	<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	0.3136	0.3146	0.0769	237.7
		0.308			
		0.3223			
	Especie vegetal	Absorbancia (nm)	Media	Blanco +	U/mg
	<i>Mucuna cf. elliptica</i> (hojas)	1.3653	1.3651	0.0769	125.17
		1.3656			
		1.3645			
Blanco +: ATA + veneno + caseína; U: unidades					

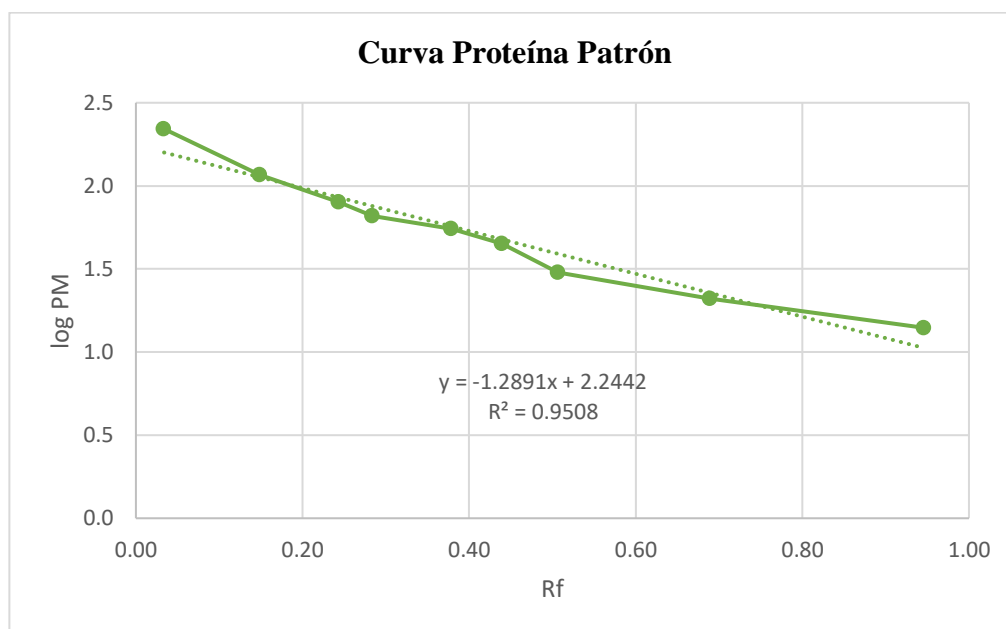
Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 18. Perfil electroforético de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Mucuna cf. Elliptica* en gel de poliacrilamida SDS-page



Nota: Elaborado por la autora, 2018

Anexo 19. Curva del RF vs el logaritmo del peso molecular de la proteína patrón



Nota: Elaborado por la autora, 2018